

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

# **KUPFFERZELL-ABHÄNGIGE REGULATION DER LEBERREGENERATION NACH PARTIELLER HEPATEKTOMIE**

Kumulative Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Kerstin Abshagen, geb. am 03.04.1978 in Kühlungsborn  
aus Kröpelin

Rostock, 01.04.2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0089-5

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar  
(Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock)
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dietmar Schiffmann  
(Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik, Universität Rostock)
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Walther  
(Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität Greifswald)

Tag der Verteidigung: 08.12.2008

Das Geheimnis des Feuers den Göttern des Olympus geraubt,  
beschwor Prometheus den Zorn des Zeus auf sich, den Herrscher über Götter und Menschheit.

Zeus strafte Prometheus, indem er ihn an den Mount Caucasus ketten ließ, an dem er von  
einem Adler gepeinigt wurde. Dieser Adler nagte nun an Prometheus Leber, welche, sobald sie  
verschlungen ward, sich sogleich erneuerte.

(IRMSCHER & JOHNE 1982)

*meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>LISTE DER PUBLIKATIONEN IM ANHANG</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2 GRUNDLAGEN DER LEBERREGENERATION</b>	<b>10</b>
2.1 Physiologische Mechanismen	10
2.2 Morphologie / Mikroarchitektur der regenerierenden Leber	14
2.3 Modelle und Techniken zur Analyse der Leberregeneration	20
<b>3 ZELLULÄRE UND MOLEKULARE MECHANISMEN DER LEBERREGENERATION</b>	<b>29</b>
3.1 Stadien der Leberregeneration	29
3.2 Zellzyklus	32
3.3 Zytokine / Wachstumsfaktoren / Transkriptionsfaktoren (humorale Faktoren)	34
<b>4 MIKROZIRKULATION BEI LEBERREGENERATION</b>	<b>43</b>
4.1 Hepatische Makro- und Mikrozirkulation nach partieller Hepatektomie	43
4.2 Scherstress als Trigger der Leberregeneration	48
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>52</b>
<b>6 LITERATUR</b>	<b>53</b>
<b>7 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>67</b>
<b>8 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>69</b>
<b>9 LEBENSLAUF</b>	<b>70</b>
<b>10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>
<b>11 DANKSAGUNG</b>	<b>75</b>

## Liste der Publikationen im Anhang

- Anhang 1**      **Abshagen K,** Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res.* 134:354-362, 2006
- Anhang 2**      **Abshagen K,** Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. Loss of NF- $\kappa$ B activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292:1570-1577, 2007
- Anhang 3**      **Abshagen K,** Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. Kupffer cells are mandatory for adequate liver regeneration by mediating hyperperfusion via modulation of vasoactive proteins. *Microcirculation.* 15:37-47, 2008

# 1 Einleitung

Die chirurgische Resektion der Leber hat in den letzten Jahrzehnten enorm an Bedeutung gewonnen und gehört nach wie vor zu den anspruchvollsten Operationen der Abdominalchirurgie. Hierbei werden heutzutage vornehmlich benigne und maligne Tumoren operativ entfernt, wodurch ein maßgeblicher Beitrag zum Behandlungskonzept bei Krebserkrankungen erbracht wird (Scheele 2001). In der faszinierenden Eigenschaft der Leber, sich zu regenerieren, liegt eine große Chance, eröffnet sie doch überhaupt erst die Möglichkeit einer (Teil-) Organspende eines lebenden Spenders (Leber-Lebendspende). Die stete Knappheit von Leichenspendern führte zur Entwicklung neuer chirurgischer Techniken. So ist die Teilung von Spenderlebern (Split-Leber-Transplantation) bzw. die Übertragung von maßgeschneiderten Leberteilen auf Kinder bereits seit längerem erfolgreich bei Spenderorganen Verstorbener entwickelt worden. Die gleiche Technik kann nun aber auch bei der Lebendspende zum Einsatz kommen (Broelsch et al. 1990; Emond et al. 1991, 1996). Bei beiden Verfahren wird lediglich ein Teil des Organs transplantiert. Häufig ist das Transplantat für den Empfänger im Verhältnis zu seiner Körpergröße zu klein (small-for-size). Studien zeigen, dass die kleinen Transplantate kontinuierlich wachsen und sich ähnlich wie nach partieller Hepatektomie (PH) regenerieren, bis das entsprechende Volumen passend zum Körpergewicht erreicht ist (Francavilla et al. 1994).

Die Erweiterung der anatomischen und topographischen Kenntnisse, die Verbesserung der operativen Techniken, die Erfahrungen zur Leberischämie und der Einsatz protektiver Maßnahmen sowie die Kenntnisse auf den Gebieten der Narkose und Intensivtherapie ebneten den Weg zur heute existierenden modernen Leberchirurgie. So kann gegenwärtig die Leberresektion, insbesondere zur Behandlung metastasierender solider Tumoren, mit sehr geringer perioperativer Letalität (Senkung von 10-25% auf mittlerweile <5% bzw. sogar <3%) und postoperativer Morbidität (Senkung von 30% auf mittlerweile deutlich <5%) durchgeführt werden (Lehnert & Golling 2001). Jedoch bleibt ein weiteres Problem gerade im Bereich der Resektion maligner Tumoren bestehen. Für die operative Verfahrenswahl waren und sind auch heute noch zwei gegensätzliche Aspekte in der Leberchirurgie bedeutsam: die onkologische Radikalität und die postoperative Leberfunktion bzw. funktionelle hepatische Reserve. Bei einer gesunden Leber sind im Extremfall Resektionen von bis zu 80% durchaus vertretbar. Bei einer kranken Leber oder aber einer Leber, bei der die postoperative Leberfunktion nicht gewährleistet bzw. die funktionelle hepatische Reserve erschöpft ist, ist die Grenze der operativen Therapie erreicht. So kommt es trotz zahlreicher Fortschritte bei einer immer noch erheblichen

Anzahl von Patienten postoperativ zu einem teilweisen oder kompletten Ausfall der Leber (Seiler et al. 2000; Nagino et al. 2001; Takeda et al. 2002). Bei Vorschädigung der Leber durch fibrotischen oder zirrhotischen Umbau kann das verbleibende Parenchym in erheblichem Maße in seiner Funktion beeinträchtigt werden. Ebenso kann eine transiente intraoperative Drosselung der Blutzufuhr (Pringle-Manöver) aufgrund des Ischämie/Reperfusionsschadens zur postoperativen Funktionseinbuße der Leber führen. Komplikationen bei Leberresektionen sind neben der postoperativen Leberinsuffizienz und der intraoperativen Blutung auch das Auftreten von Lebernekrosen, Gallefisteln, postoperativen Blutungen oder subphrenischen Abszessen (Mann et al. 2001). Sekundär können Nierenfunktionsstörungen bis hin zum dialysepflichtigen Nierenversagen, Kreislaufinsuffizienz sowie hämatologische Funktionseinbußen, wie Gerinnungsstörungen, resultieren. Ursachen der postoperativen Leberdysfunktion sind neben der Verschlechterung des schon bestehenden Grundleidens (Virushepatitis, chronische Lebererkrankung, Leberverfettung) auch Medikamente durch die Anästhesie (z.B. Isofluran), intra- bzw. postoperative Transfusionen und Blutverluste, Schock, Hypoxie oder extrahepatische Gallengangsobstruktionen sowie eine postoperative nicht ausreichende Restleberfunktion. Außerdem kann eine zu lange Abklemmzeit der Leber einen ischämischen Leberschaden bedingen, welcher die Lebersyntheseleistung maßgeblich beeinträchtigt und im hepatorenalen Syndrom enden kann. Des Weiteren gibt es eine Reihe von experimentellen Studien, die eine Schädigung der zu kleinen Restleber durch hämodynamische Kräfte nahe legen und zur Postulierung eines portalen Hyperperfusionssyndroms (small-for-size Syndrom) führten (Tucker & Heaton 2005; Glanemann et al. 2005a). Dieses beinhaltet eine übermäßige portale Perfusion, d.h. eine hämodynamische oder funktionelle Überbeanspruchung der relativ zu kleinen Restleber mit Aufweitung der Sinusoide (Gertsch et al. 1997; Wack et al. 2001). Die genauen pathophysiologischen Ursachen, die zur Entstehung des Posthepatektomie-Leberversagens führen, werden gegenwärtig intensiv beforscht, sind jedoch bisher nur unzureichend verstanden. Größere Kenntnisse zu den pathophysiologischen Zusammenhängen könnten weitere Verbesserungen der postoperativen Ergebnisse bedeuten.

Die dargestellten Gefahren und Komplikationen zeigen in eingehender Deutlichkeit, dass nicht erst postoperativ nach Auftreten der Komplikationen gehandelt, sondern schon präoperativ und auch intraoperativ abgewogen werden muss, inwieweit die Leberresektion unter Gewährleistung einer ausreichenden Restleberfunktion möglich ist. Vielversprechende Strategien, wie z.B. präoperative Chemoembolisation mit Induktion einer Hypertrophie des Leberlappens, Stimulation der Leberregeneration mittels hepatischer Wachstumsfaktoren, präoperative gentherapeutische Einschleusung von



Effektorgenen der Leberregeneration, sowie die persönliche Erfahrung des Operators sollten berücksichtigt werden, um das Risiko einer postoperativen Leberinsuffizienz zu reduzieren (Raab et al. 2000; Clavien et al. 2007).

Für die Leberchirurgie ist es deshalb von großer Bedeutung, die zellulären Mechanismen der regenerativen Antwort der Leber zu verstehen, um den Prozess der Regeneration nach Leberresektion oder -Transplantation gezielt beeinflussen zu können. Die Möglichkeit die Leberregeneration nach PH spezifisch zu stimulieren, könnte die Zahl erfolgreicher Tumorresektionen, small-for-size Transplantationen und Leber-Lebendspenden stark erhöhen. Gleichzeitig unterstützen die Untersuchungen zur Leberregeneration die Entwicklung neuer Organersatzverfahren für Patienten mit akutem Leberversagen oder Leberausfallkoma, welche u.a. auf isolierten und kultivierten Hepatozyten basieren. Dieses sogenannte ‚Hepatic Tissue Engineering‘ beinhaltet gegenwärtig intrakorporale Leberunterstützungssysteme, wie die Injektion von Leberzellen und Implantation von Leberzell-Matrizes sowie extrakorporale Leberunterstützungssysteme, wie das Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) (Mitzner et al. 2000). Die Erforschung regenerativer Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene stellt darüber hinaus die Basis für das Verständnis zahlreicher Lebererkrankungen, wie z.B. akuter Leberschädigung durch Toxin oder fibroproliferativer Lebererkrankungen, und für Verbesserungen in deren Therapie dar, was folglich den Bedarf an Lebertransplantationen reduzieren könnte. Obwohl viele experimentelle Ansätze fern der klinischen Anwendung sind, ist es wichtig, die tierexperimentellen Daten zur Leberregeneration für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien heranzuziehen. Zudem stellt die Leberregeneration aus Sicht des Biologen ein einzigartiges *in vivo*-Modell dar, um Signaltransduktions- und Zellzyklus-Prozesse zeitgleich zu studieren. Demnach ist die Verschmelzung von biologischem Grundwissen und klinischen Fragenstellungen für das Management und die Entwicklung neuer Therapiestrategien äußerst wichtig. Zusätzlich könnte das Verständnis der regenerativen Mechanismen der Leber - das Paradebeispiel für das ‚*in vivo*-Tissue Engineering‘ - helfen, dieses Wissen auf andere Organe, welche nicht zur Regeneration fähig sind, zu übertragen, und somit einen entscheidenden Beitrag im Bereich Regenerative Medizin und Tissue Engineering liefern.

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren ist die Pathophysiologie der Leberregeneration, das komplexe Zusammenspiel extrazellulärer und intrazellulärer Mechanismen, besonders der Nichtparenchymzellen der Leber, noch weitgehend unbekannt. Die Kupffer Zelle (KC) scheint - u.a. aufgrund der Bildung und Freisetzung wachstumsstimulierender und -inhibierender Faktoren - ein essentieller Baustein im

multifaktoriellen Prozess der Leberregeneration zu sein, dessen funktionelle Mechanismen für die Entwicklung supportiver Therapiestrategien genauer untersucht werden sollten. Hierfür bietet die selektive Depletion der KC mittels Clodronat-Liposomen (van Rooijen et al. 1997; van Rooijen & van Kesteren-Hendrikx 2002) eine elegante Methode, um die Beteiligung der KC an der Regulation der Leberregeneration *in vivo* zu untersuchen (Boulton et al. 1998; Takeishi et al. 1999; Meijer et al. 2000; **Abshagen et al. 2007, 2008**). Mittels dieser Technik werden die KC - im Gegensatz zu anderen Substanzen, wie Gadoliniumchlorid (Rüttinger et al. 1996; Rai et al. 1996, 1997; Ding et al. 2003; Lee et al. 2004) - auf nicht-toxische, physikalische Weise spezifisch und effektiv eliminiert, ohne *per se* aktiviert zu werden (van Rooijen 1989; van Rooijen et al. 1997).

Daher wird sich diese Arbeit im Weitesten mit dem Prozess der Leberregeneration nach 70%-iger Resektion hinsichtlich morphologischer, zellulärer und molekularer sowie hämodynamischer Ereignisse beschäftigen, und hierbei insbesondere die Bedeutung der KC während dieses Prozesses als ein mögliches therapeutisches Target hervorheben.

## 2 Grundlagen der Leberregeneration

### 2.1 Physiologische Mechanismen

Bereits in der Antike war bekannt, dass die Leber eine erhebliche regenerative Kapazität aufweist (Sage des Prometheus). Aufgrund dieser Eigenschaft der Leber können mehr als 80% des Leberparenchyms reseziert werden, ohne dass lebenswichtige Stoffwechselvorgänge nachhaltig ausgeschaltet werden. Durch hypertrophische und hyperplastische Vorgänge beobachtet man beim Menschen bereits nach 6 Monaten eine komplette Rekonstitution von normal funktionierendem Lebergewebe (Court et al. 2002). Dieses Phänomen wird weltweit in experimentellen Modellen untersucht, um die regulatorischen Mechanismen der hepatozellulären Proliferation zu verstehen (Fausto 2001). Der Prozess der Leberregeneration ist sehr komplex und erfordert das Zusammenspiel multipler Signalwege, welche gleichzeitig oder in bestimmter Reihenfolge in den spezifischen Zelltypen der Leber aktiviert werden. Charakteristisch für die regulatorischen Netzwerke, bestehend aus Zytokinen, Wachstumsfaktoren und metabolischen Faktoren, ist, dass zwischen den intrazellulären Komponenten dieser Netzwerke Redundanzen existieren, so dass das Fehlen eines einzelnen Genes selten zur kompletten Inhibition der Leberregeneration führt (Fausto et al. 2006).

Das Wort Regeneration ist in diesem Fall irreführend, da die Leber nicht ähnlich der Regeneration von Extremitäten bei Amphibien „nachwächst“. Es handelt sich vielmehr um eine kompensatorische Hyperplasie im verbleibenden Lebergewebe (Fausto 2000; Taub 2004). Die optimale Größe wird dabei entsprechend der Ratio zwischen Leber und Körpergewicht erreicht. Beim gesunden Erwachsenen wird der Untergang von Leberzellen durch permanente Proliferation anderer Hepatozyten kompensiert und somit eine gleichbleibende Leberzellmasse sichergestellt (Diehl & Rai 1996). So wachsen z.B. Lebern kleiner Spender, welche in größere Empfänger transplantiert werden (small-for-size), zu der dem Körpergewicht entsprechenden Größe heran und *vice versa* (Francavilla et al. 1994). Für Transplantate mit einer Ratio kleiner als 0,8-1,0% existiert jedoch eine limitierte Wachstumskapazität, welche mit einer hohen Mortalität einhergeht. Die Regeneration der Leber nach 70%-iger Hepatektomie ist außerordentlich schnell, dabei aber sehr unterschiedlich zwischen den Spezies: 7-15 Tage in Nagetieren (Pistoi & Morello 1996; Michalopoulos & DeFrances 1997), wobei nach 3 Tagen schon 70% des präoperativen Lebergewichts erreicht werden (**Abshagen et al. 2006**) und 3-6 Monate im Menschen, während die Leber schon nach 2-3 Wochen ihre normale Funktion erreicht (Chen et al. 1991). Verschiedene Faktoren beeinflussen die Intensität der Regenerations-

vorgänge. Hier sind vor allen Dingen das Alter und Geschlecht des Tieres bzw. des Menschen, das Ausmaß und die Art der Leberschädigung zu nennen (Steer 1995; Fausto 2001; Yokoyama et al. 2005, 2007). Während bei einer 30%- und 85%-igen Resektion die Proliferation der Hepatozyten nicht synchron verläuft, erscheint bei 40-70%-igen Resektionen die Restauration der Lebermasse proportional zum Ausmaß der Resektion. Hierbei benötigt eine erkrankte Leber doppelt so lange zur Regeneration als ein gesundes Organ (Yamanaka et al. 1993). Im Zuge der Regeneration ist die Leber jederzeit zur Aufrechterhaltung des Zuckerstoffwechsels und zur Synthese von ca. 2500 lebenswichtigen Eiweißen fähig. Während die Leber nach 60%-iger Resektion beim Menschen in aller Regel problemlos regeneriert, kann nach erweiterter Resektion, z.B. wegen schwerster Verletzung der Leber oder nach Resektion großer bösartiger Lebertumoren, der lebenswichtige Metabolismus nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Leber regeneriert zu langsam und der Patient verstirbt im Leberkoma, da die Entgiftungsfunktion der Restleber versagt.

Gewöhnlich regeneriert sich die Leber über Proliferation der vorhandenen reifen Hepatozyten und nicht wie andere sich regenerierende Gewebe, wie Knochenmark und Haut, über Stamm- oder Vorläuferzellen (Michalopoulos & DeFrances 1997). Kommt es jedoch zu einer Leberzellschädigung, in deren Folge die Proliferationsantwort der Hepatozyten ungenügend ist, wie z.B. im Galaktosamin-Modell oder während der Hepatokarzinogenese, wird ein sekundäres Proliferationskompartiment aktiviert, das aus hepatischen Stammzellen besteht (den sog. „oval-cells“, Ovalzellen) (Dabeva & Shafritz 1993; Fausto 2000, 2001, 2004; Libbrecht & Roskams 2002). Diese undifferenzierten Leberzellen proliferieren und erzeugen aktiv Tochterzellen, die sich wiederum in reife Hepatozyten ausdifferenzieren (Michalopoulos 1994; Thorgeirsson 1996). Umgekehrt ist es jedoch für die Nichtparenchymzellen, die sich während der Leberregeneration bis zu 20% aus Knochenmark-Vorläuferzellen generieren (Fujii et al. 2002). Die ungewöhnlich hohe Regenerationsfähigkeit der Leberzellen, im Vergleich zu anderen hochdifferenzierten Zellen des Organismus, lässt sich mit ihrer beträchtlichen Replikationskapazität erklären (Court et al. 2002). Die Hepatozyten sind in der Lage, bis zu 80 Zellteilungen zu durchlaufen (Overturf et al. 1999), wohingegen Säugetierzellen normalerweise bereits nach 20-30 Zellteilungen altern (Fausto 2001). Meist muss die Leber ihre volle Regenerationskapazität jedoch nicht ausnutzen. Nach Rückantwort des Organismus kehren die Hepatozyten oft nach 1-2 Zellteilungen in ihren Ruhezustand (G0-Stadium) zurück (Fausto 2000). In Experimenten zur Repopulation geschädigter Lebern konnte gezeigt werden, dass 100 bis 1000 transplantierte Hepatozyten ausreichen, um die Leber vollständig zu repopularisieren (Rhim et al. 1994; Rhim et al. 1995). In Lebern adulter

Nagetiere sind nur 20-25% der Hepatozyten diploid, während der Großteil der Hepatozyten tetraploid ist und sogar 5-10% oktaploid. Interessanterweise besitzen die Hepatozyten aller Ploidie-Klassen die gleiche proliferative Kapazität (Weglarz et al. 2000), welche jedoch mit zunehmendem Alter abnimmt (Iakova et al. 2003). Im Tiermodell kann eine Leberresektion von 60% nach jeweils zehn Tagen Regenerationszeit mehrfach ohne Einbuße der Organrekonstitution wiederholt werden.

Normalerweise verweilen die Hepatozyten im Ruhestadium (G0-Stadium), in dem sie ihre Synthese- und Entgiftungsfunktionen sowie ihre sekretorischen Leistungen ausüben (Ascher et al. 1993; Fausto 2000). So durchläuft in Ruhe nur einer von tausend Hepatozyten eine Mitose (Diehl & Rai 1996; Court et al. 2002). Durch Schädigung der Leber werden die intakten Hepatozyten, ebenso wie weitere Zellen der Leber, durch Freisetzung wachstumsregulierender Faktoren aktiviert. Hierbei führen vielfältige Stimuli dazu, dass die Leberzelle aus der G0-Phase in die G1-Phase übertritt und im weiteren Verlauf stufenweise den Zellzyklus komplett durchläuft (Kountouras et al. 2001). Das Lebergewebe nimmt solange zu bzw. ab, bis durch ein optimales Verhältnis zwischen Leberzell- und Körpermasse eine einwandfreie Stoffwechselfunktion gesichert ist (Kountouras et al. 2001). Dies legt komplexe Steuerungsmechanismen der Leberregeneration auf zellulärer Ebene nahe, welche bislang noch nicht genau identifiziert wurden.

Als physiologische Triggermechanismen zur Leberregeneration existieren eine Reihe unterschiedlicher Hypothesen. Zum einen wird davon ausgegangen, dass die regenerative Antwort durch einen Funktionsverlust aufgrund untergegangener oder resezierter Lebermasse determiniert wird. Dieses Konzept beinhaltet die sequenzielle Aktivierung intra- und extrahepatischer Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und deren Rezeptoren sowie verschiedener Metaboliten. Infolge stimulieren diese über autokrine, parakrine und endokrine Mechanismen intrazelluläre Signalwege, die für das Überleben und Proliferation der Zellen von essentieller Bedeutung sind. Die zweite grundlegende Hypothese der Leberregeneration beinhaltet, dass die Leberregeneration durch hämodynamische Faktoren getriggert wird, was im späteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert wird (siehe 4.2.). Insgesamt lässt sich aus der vorhandenen Datenlage zu den Triggermechanismen der Leberregeneration postulieren, dass beide Mechanismen, also der Parenchymverlust und portale hämodynamische Faktoren, eine Rolle spielen. Dabei nehmen insbesondere die KC eine zentrale Stellung ein, indem sie sowohl durch die Bildung und Freisetzung wachstumsmodulierender Faktoren, als auch durch die Regulation der Mikrozirkulation via Modulation vasoaktiver Mediatoren die Proliferation von Zellen beeinflussen können (**Abshagen et al. 2007, 2008**).

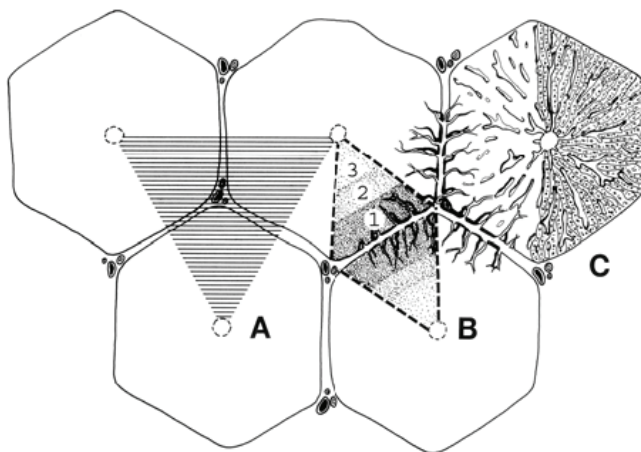
Im Verlauf der Leberregeneration muss die Leber ihre organspezifischen Funktionen aufrechterhalten. Diese Notwendigkeit unterscheidet das molekularbiologische Ereignis der Leberregeneration von dem des fetalen oder neoplastischen Wachstums, bei dem die Expression der „wachstumsspezifischen“ Gene eine höhere Priorität als die Expression von „gewebespezifischen“ Genen besitzt. Die für die schnelle Zellteilung und das Gewebewachstum benötigte Energie wird von den Hepatozyten in Form von Triacylglycerol und Cholesterolestern, welche nach PH verstärkt in intrazellulären Lipidtropfen gespeichert werden, bereitgestellt (Farrell 2004). Auf diese Weise ist die gesunde Leber in der Lage, nach extremer Schädigung wie der 70%-igen Hepatektomie unter gleichzeitiger Aufrechterhaltung ihrer Funktion, innerhalb von ca. 2 Wochen (Ratte/Maus) bis Monaten (Mensch) vollständig zu regenerieren (Michalopoulos 1994; Diehl & Rai 1996). Umgekehrt findet aber auch eine negative Regulation, d.h. ein wachstumshemmender Einfluss auf die Leber, z.B. bei zu großen Transplantaten, statt. Insgesamt ist ein ausgewogenes Verhältnis von positiven und negativen Stimuli erforderlich, um die Proliferation von Hepatozyten zu regulieren. So existieren pro-regenerative Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) oder TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor-alpha) (Webber et al. 1994a), während TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor-beta) oder Activin A als inhibitorische Wachstumsfaktoren identifiziert wurden (Bissell et al. 1995; Fausto 2001). Beide Arten von Wachstumsfaktoren werden nach PH vermehrt exprimiert und garantieren durch ein sensibles Gleichgewicht zueinander eine kontrollierte Zellproliferation (Fausto et al. 1995; Court et al. 2002). Ist die ursprüngliche Größe der Leber wieder erreicht, stoppt automatisch der Wachstumsprozess (Kountouras et al. 2001). Nur ein voll funktionsfähiger Leberlappen, der den Stoffwechselbedürfnissen des Patienten in ausreichendem Maße Genüge trägt, erlaubt eine vollständige Rekonvaleszenz. Umfassende Untersuchungen sind daher erforderlich, um die Funktionsreserven der Leber, das noch tolerable Resektionsausmaß und die Regenerationsfähigkeit des Restparenchyms möglichst sicher vor einer Operation einschätzen zu können, um gegebenenfalls - bei zu hohem Operationsrisiko - von der Resektion Abstand zu nehmen.

Der überwiegende Teil an experimentellen Studien zur Leberzellregeneration ist an *in vivo*-Modellen untersucht worden (Koniaris et al. 2003). Hierbei kamen genmanipulierte Tiere und speziell das experimentelle Modell der PH zur Anwendung (Court et al. 2002). *In vitro*-Experimente, z.B. mit primären Hepatozytenkulturen, erwiesen sich häufig als technisch schwer durchführbar, da Hepatozyten nach der Isolierung nur für kurze Zeit vital und differenziert bleiben, bevor sie ihre Hepatozyten-typische Funktion und Morphologie verlieren (Runge et al. 2000). Des Weiteren können primäre Hepatozyten-Kokulturen die

komplexen Interaktionen zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen nur unzureichend simulieren. Die Gesamtheit der Versuche geben jedoch neue Einblicke in die Mechanismen der Regulation der Leberregeneration und der physiologischen Lebermasse und stellen ein Beitrag zur Entwicklung neuer Ansatzpunkte zur Stimulation der Leberzellregeneration dar.

## 2.2 Morphologie / Mikroarchitektur der regenerierenden Leber

Die Struktur der Leber steht in enger Beziehung zur Vielfalt ihrer komplexen Funktionen. So sind die Hämodynamik, die metabolische Heterogenität der Hepatozyten sowie die Struktur ihrer funktionellen Einheiten Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der mannigfaltigen Funktionen der Leber. Es gibt drei Konzepte zur Strukturierung des Leberparenchyms: das Leberläppchen, das Portalvenenläppchen und den Leberazinus (Abb. 1). Hierbei unterscheidet man eine morphologisch kleinste und eine funktionell kleinste Einheit der Leber.



**Abb.1. Gliederung der Leber** (Liebich 1999).

A: periportale Läppchen mit Lebertrias,  
 B: Leberazini mit zonaler Gliederung nach Rappaport, 1: periportale Zone, 2: midzonale Zone, 3: perizentrale Zone,  
 C: klassisches Leberläppchen mit Zentralvene

Die morphologisch kleinste Einheit der Leber stellt das **Leberläppchen** (Lobulus) dar (Krstić 1991), welches aus einer abführenden Zentralvene (V. centralis) und einem darauf ausgerichteten Netzwerk aus radiär angeordneten Leberzellbalken und Sinusoiden besteht. Die periportalen Felder zwischen drei bis vier Leberläppchen enthalten die Gefäße der Glisson'schen Trias, gebildet aus Vv. und Aa. interlobuläres und ableitenden Gallengängen. Die Wand der Sinusoide wird von fenestrierten Endothelzellen (EC) gebildet, welche im Unterschied zu normalen Kapillaren keiner Basalmembran aufsitzen (Junqueira & Carneiro 1989). Stattdessen verbleibt zwischen Endothel- und Epithelzellen der perisinusoidale Disse'sche Raum. Eine intakte Auskleidung der Lebersinusoiden durch EC ist Voraussetzung für eine ungehinderte mikrovaskuläre Perfusion der Sinusoide. Die



Fenestrierungen der EC beinhalten dynamische Strukturen, deren Durchmesser von Blutdruck, vasoaktiven Substanzen, Medikamenten und Giften abhängig sind (Fraser et al. 1980). Diese leberspezifische Besonderheit ermöglicht eine maximale Passage niedermolekularer Substrate zwischen dem sinusoidalen Lumen und den Hepatozyten, während zelluläre Bestandteile (Blutzellen) und hochmolekulare Partikel (z.B. Chylomikronen) in den Sinusoiden zurückgehalten werden (Wisse 1970). Da in den Disse'schen Raum die Mikrovilli der Leberzellen ragen, stellt er einen direkten Kontakt der Hepatozyten zum Blut her. Der Disse'sche Raum dient somit als Kommunikationsort zwischen den Parenchym- und Nichtparenchymzellen. Die Gliederung der Leber in Leberläppchen folgt einer *strukturell-deskriptiven* Einteilung, während die Gliederung der Leber in **Portalvenenläppchen** den *funktionell-sekretorischen* Drüsencharakter der Leber darlegt (Vonnahme 1993).

Als funktionell kleinste Einheit wird der **Leberazinus** nach Rappaport (1958) definiert, wobei als Zentrum des Azinus das Portalfeld mit seinen Gefäßen (Pfortaderast, Leberarterie, Gallengang) anzusehen ist. Hierbei veranschaulichte Rappaport die mikrozirkulatorische Bedeutung des Azinus (Rappaport 1976). Die um die Sinusoide angeordneten Hepatozyten bilden drei metabolische, unterschiedlich gut durchblutete Zonen, wobei die Sinusoide in Richtung auf die Zentralvene mit abnehmender Geschwindigkeit vom Blut durchflossen werden. Rappaport teilt den Verlauf der Sinusoide eines Azinus in 3 Zonen gleicher Länge vom Portalfeld ausgehend ein: Zone 1 (periportale Zone) umfaßt die Hepatozyten, die unmittelbar um die Azinusachse angeordnet sind und die somit zuerst mit dem die Leber versorgenden Blut in Kontakt treten. Zone 1 wird infolgedessen von sauerstoffreichem, arterioportalem Mischblut relativ schnell durchströmt. Die Sinusoide dieser Zone besitzen den geringsten Durchmesser, der Sauerstoffpartialdruck, die Glukoneogeneserate sowie der oxidative Stoffwechsel von Aminosäuren und Fettsäuren sind dort am höchsten (Rappaport 1973). In Zone 2 (midzonale Zone) vermindern sich Sauerstoffgehalt und Durchströmungsgeschwindigkeit des Blutes. Zone 2 liegt als funktioneller, topographischer und morphologischer Übergangsbereich zwischen Zone 1 und Zone 3 (Rappaport 1973; Komatsu et al. 1990). Aufgrund der Modifikation des Blutes in Zone 1 und 2 ist es schlüssig, dass die Hepatozyten der Zone 3 (perizentrale Zone) im Zentralvenenbereich am vulnerabelsten auf Hypoxie, Nährstoffmangel und Blutdruckschwankungen reagieren. Zone 3 besitzt die Sinusoide mit dem größten Durchmesser, den niedrigsten Sauerstoffpartialdruck und die höchste Aktivität mikrosomaler Enzyme (Rappaport 1973). Im perizentralen Teil des Azinus finden daher überwiegend Glycogensynthese, Liponeogenese und Detoxifikations-



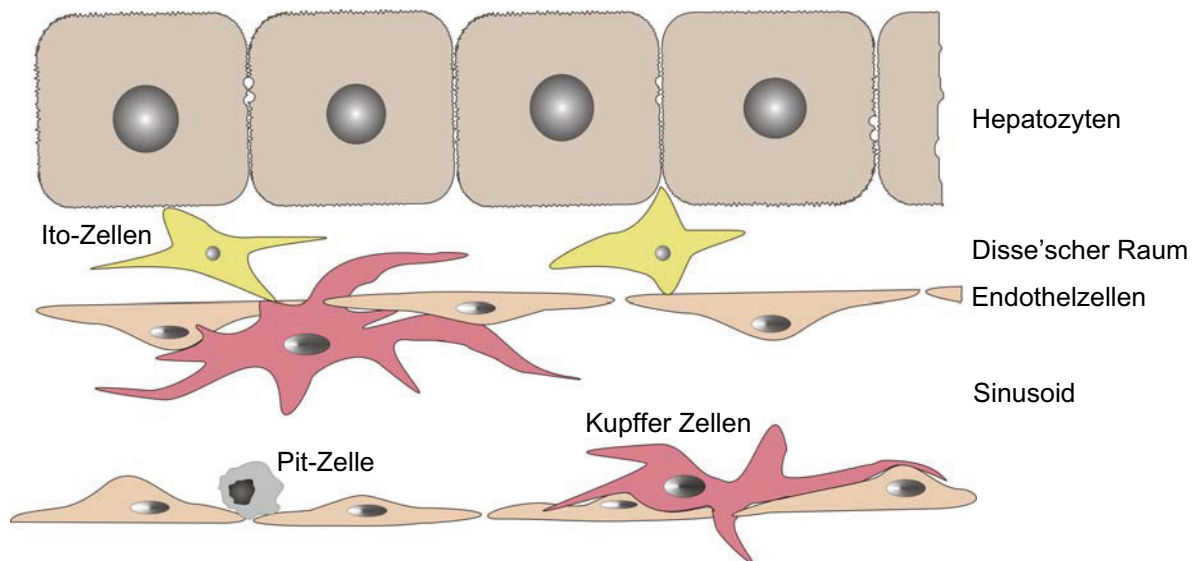
prozesse statt (Jungermann & Katz 1982). Die Gliederung der Leber in Azini folgt einer *funktionell-stoffwechselaktiven* Beurteilung.

Das Lebergewebe setzt sich aus einem zellulären Volumen von etwa 80-84% und einem Extrazellularraum (Sinusoide, Disse'scher Raum, Gallengänge, extrazelluläre Matrix (EZM)) von ca. 16-20% zusammen (Gressner 2003). Die Hepatozyten sind die Parenchymzellen der Leber und stellen mit einem Anteil von 94% am Zellvolumen und 65% der Zellzahl die quantitativ wichtigste Zellpopulation dar. Sie sind Ort verschiedener Synthese-, Stoffwechsel- und Exkretionsleistungen (Glukoneogenese, Proteinbiosynthese, Konjugation von Gallensäuren) (Van Bossuyt et al. 1988). Die Heterogenität der Hepatozyten bezüglich ihrer Genexpression und metabolischen Funktion ist durch die zonal differente Durchblutung und Nährstoffverfügbarkeit in den Azini bedingt. Die Nichtparenchymzellen der Leber umfassen EC (70%), KC (20%), Ito- (10%) und Pit-Zellen (1%) (Abb. 2) (Bouwens & Wisse 1992; Friedman 2000). Die enormen Funktionen der Leber werden durch komplexe Wechselwirkungen zwischen den fünf Leberzelltypen realisiert.

Eine maßgebliche Rolle im Rahmen der Leberregeneration spielen die KC (Meijer et al. 2000; **Abshagen et al. 2007, 2008**), die ortsständigen Makrophagen der Leber, welche ca. 80-90% der gesamten Gewebsmakrophagen des Organismus repräsentieren (Saba 1970). Sie befinden sich - den sinusoidalen EC angeheftet - in den Sinusoiden und ragen mit ihren langen zytoplasmatischen Fortsätzen in den Disse'schen Raum bis zu den Hepatozyten. Innerhalb des Leberazinus weisen die KC Heterogenität in Größe und Funktion auf. So befinden sich in den periportalten Bereichen des Azinus doppelt so viele und größere KC mit höherer Enzymaktivität (Naito et al. 2004). Aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer großen Anzahl bilden die KC eine der bedeutendsten Nichtparenchymzell-Population, welche für die Phagozytose makromolekularer Fremdstoffe und Antigenpräsentation, sowie für die Freisetzung von Zytokinen (Decker 1990), Prostanoiden, reaktiven Sauerstoffspezies (Bhatnagar et al. 1981; Busam et al. 1990; Grewe et al. 1992) und vasoaktiven Mediatoren, wie z.B. Kohlenmonoxid (CO), verantwortlich ist. Daher sind die KC in einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse maßgeblich involviert.

Des Weiteren sind im Disse'schen Raum die Ito-Zellen (auch hepatische Sternzellen, Fettspeicherzellen, Lipozyten) lokalisiert, welche in der normalen Leber in einer ruhenden, nicht-proliferativen Form vorkommen. Mit ihren langen Zytoplasmaausläufern umgreifen sie den Sinusoid und interagieren mit Nachbarzellen. Durch ihre vielfältigen Funktionen, wie der Speicherung und Homöostase von Retinoiden, der Regulation sinusoidaler Gefäßdurchmesser sowie der Synthese von EZM durch Produktion von Kollagen,

Matrixmetalloproteinasen (MMP's), Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Sato et al. 2003) spielen die Ito-Zellen hinsichtlich der Bildung von EZM eine wesentliche Rolle während der Leberregeneration. Außerdem sind Ito-Zellen über perisinusoidale Filamente an der Regulation des vaskulären Tonus der Lebersinusoide beteiligt (Wake & Sato 1993), wobei die Kontraktion dieser Filamente wahrscheinlich über lokale Mediatoren der KC erfolgt (Kawada et al. 1993; Takei et al. 1993).



**Abb.2.** Zellulärer Aufbau der Leber.

Eine ideale Möglichkeit, die Leberzellregeneration in Bezug auf dynamische Veränderungen auch bildlich wiederzugeben, bietet die Intravitalmikroskopie (Uhlmann et al. 1999). Neben standardisierten *in vitro*-Methoden ist es mit Hilfe der Intravitalmikroskopie möglich, den Wiederaufbau der Mikroarchitektur der Leber nach PH *in vivo* zu verfolgen (Vogten et al. 2003; **Abshagen et al. 2006**).

Um während der Leberregeneration lebenswichtige gewebespezifische Funktionen aufrechtzuerhalten und eine erfolgreiche Rekonstitution der Organarchitektur zu gewährleisten, müssen die proliferativen Antworten der Leberzellpopulationen gut koordiniert sein. Der Regenerationsprozess der Leber ist durch eine Kombination aus Hypertrophie und Hyperplasie der Leberzellen gekennzeichnet. Durch funktionelle Mehrbelastung wird zunächst die Kapazität des verbliebenen Leberparenchyms überschritten, was zu einer temporären Leberzellverfettung führt. Deshalb kommt es innerhalb weniger Stunden nach PH durch vermehrte Einlagerung von Triglyzeriden zum Anschwellen der Hepatozyten und zur Bildung intrazellulärer Vakuolen (blasenförmige Lipideinlagerungen), was zunächst eine Vergrößerung und Verfettung der verbleibenden Leberlappen zur Folge hat. Ultrastrukturell ist dieser frühe Effekt durch vergrößerte

sinusoidale Fenestrierungen charakterisiert, welche nun größeren Partikeln, wie Chylomikronen, die Passage in den Disse'schen Raum erlauben (Morsiani et al. 1995). Aufgrund der Hypertrophie, welche in den ersten Tagen nach PH gegenüber der Hyperplasie dominiert, konnten wir intravitalmikroskopisch vergrößerte hepatozelluläre Kerne, breitere Hepatozytenstränge und demzufolge eine geringere Dichte an Hepatozyten beobachten (**Abshagen et al. 2006**). Unsere *in vivo*-Beobachtungen bestätigen sich durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Vizzotto et al. 1989), welche neben stark dilatierten Sinusoiden v.a. in den periportalen Regionen und Verlust der normalen Zell-Zell-Kontakte zwischen den Hepatozyten auch eine Schrumpfung des hepatozellulären Zytoplasmas zeigen. Charakteristisch für diese initiale Phase der Regeneration sind außerdem ein verkleinerter Disse'scher Raum und der angehende Abbau der EZM durch MMP's (Malik et al. 2002). Die nun beginnende Hyperplasie ist durch eine wellenförmige Replikation der Hepatozyten gekennzeichnet. Die erste und höchste Proliferationsaktivität durchlaufen ca. 24 Stunden nach der Resektion die Hepatozyten, welche sich im periportalen Bereich befinden. Perizentrale Hepatozyten treten später, ca. 36-48 Stunden nach Resektion, in die proliferative Phase des Zellzyklus ein (Rozga 2002). Nach 72 Stunden ist nach 1-2 Replikationsrunden die Proliferation der Hepatozyten abgeschlossen. Aufgrund des Ungleichgewichtes der Replikationsrate an Hepatozyten und der umgebenden EZM zeigt sich morphologisch zunächst ein Verlust der normalen Leberarchitektur. Die neu gebildeten Hepatozyten sind ohne begleitende Sinusoide in Clustern angeordnet, welche aus ca. 10-14 Zellen bestehen (Martinez-Hernandez & Amenta 1995). Die Nichtparenchymzellen beginnen 24-48 Stunden später als die Hepatozyten mit der DNA-Synthese (**Abshagen et al. 2006**), welche dann mit ihren Zellfortsätzen in die avaskulären Hepatozyten-Cluster einwandern. Entsprechend zeigte sich in unserer Studie ein später Proliferationspeak der Nichtparenchymzellen an Tag 5 nach PH, während Hepatozyten das Proliferationsmaximum bereits 3 Tage nach Resektion aufwiesen (**Abshagen et al. 2006**). Diese chronologische Abfolge der Zellproliferation impliziert, dass Hepatozyten mitogene Stimuli für die Proliferation der Nichtparenchymzellen bereitstellen. So kommt es zwei bis vier Tage nach PH durch Proliferation und Migration fenestrierter EC und Ito-Zellen in die Hepatozyten-Cluster zur Unterteilung der Hepatozyteninseln in Leberzellbalken (Michalopoulos & DeFrances 1997). Elektronenmikroskopisch sind besonders an den postoperativen Tagen 3 und 4 vermehrt Membrankontakte von Hepatozyten mit benachbarten Nichtparenchymzellen zu beobachten (Budny et al. 2007). Baier et al. (2005) konnten zeigen, dass die Repopulation der KC nach PH nicht nur über deren lokale Proliferation, sondern auch durch Infiltration von KC ins Lebergewebe erfolgt. Unter Mitwirkung weiterer

Nichtparenchymzellen und gleichzeitiger Resynthese von extrazellulären Matrixproteinen werden Sinusoide, zu- und abführende Gefäße und der Disse'sche Raum rekonstituiert und somit die ursprüngliche Leberarchitektur wiederhergestellt. In Nagetieren zeigt die regenerierte Leber nach ca. 14 Tagen eine geordnete Leberhistologie mit normaler hepatozellulärer Struktur (Budny et al. 2007).

Während die Regeneration der Parenchymzellen gut charakterisiert ist, sind viele Aspekte der Nichtparenchymzell-Regeneration nicht ausreichend geklärt. Die Ito-Zellen lassen sich aufgrund der Autofluoreszenz des gespeicherten Vitamin-A intravitalmikroskopisch unter UV-Epiillumination darstellen (Suematsu et al. 1993; **Abshagen et al. 2006**), wobei die Anzahl an Vitamin-A Partikel die Anzahl an Ito-Zellen widerspiegelt (Zhang et al. 1994; Bauer et al. 1995). Infolge der proliferationsbedingten Vergrößerung der Hepatozyten nach PH konnten wir auch eine geringere Dichte an Ito-Zellen beobachten (**Abshagen et al. 2006**; Budny et al. 2007). Gleichzeitig wird aber eine transient erhöhte Ito-Zell/Hepatozyten Ratio beschrieben (Mabuchi et al. 2004; Budny et al. 2007). Infolge der Leberschädigung ändern die im Disse'schen Raum lokalisierten „ruhenden“ Ito-Zellen ihren Phänotyp (Senoo 2004). Kennzeichen der durch die PH „aktivierten“ Ito-Zellen ist sowohl die Expression von  $\alpha$ -SMA (alpha-Smooth Muscle Actin) (Budny et al. 2007) als auch der Verlust von gespeichertem Vitamin-A (**Abshagen et al. 2006**). Intravitalmikroskopisch konnten wir dieses Ereignis nach PH anhand einer schwächeren Autofluoreszenz der Ito-Zellen beobachten (**Abshagen et al. 2006**). Welche Faktoren die Ito-Zellen zur Proliferation anregen, ist jedoch noch unbekannt. Es wird allerdings eine Aktivierung der Ito-Zellen durch KC-abhängige Zytokine, wie TGF- $\beta$  (Matsuoka et al. 1989) und IL-6 (Interleukin-6) diskutiert. Die meisten aktivierten Ito-Zellen sind dicht um die Hepatozyten-Cluster angeordnet (Mabuchi et al. 2004; Budny et al. 2007), wo sie mit der Synthese und Einlagerung großer Mengen EZM-Komponenten in die avaskulären Inseln beginnen und u.a. die Einwanderung von EC fördern (Martinez-Hernandez & Amenta 1995; Wack et al. 2001). Die Bildung neuer Sinusoide ist besonders wichtig für eine adäquate Blutversorgung der neu entstandenen Hepatozyten. Die hepatische Neoangiogenese, d.h. Regeneration von sinusoidalen EC, geht überwiegend von aus dem Knochenmark freigesetzten, zirkulierenden Hämangioblasten aus, die durch initial proliferierende EC rekrutiert werden und dann in die neu gebildeten Hepatozytencluster einwandern (Michalopoulos & DeFrances 1997). Unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder Angiopoetin, stimulieren die Neubildung von sinusoidalen Endothelien (Shimizu et al. 2005). VEGF wird hauptsächlich in den periportalen Hepatozyten zwei bis vier Tage nach PH exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der Neoangiogenese durch Steigerung der sinusoidalen EC-Proliferation

aus den eingewanderten Hämangioblasten und durch Erhöhung der sinusoidalen Fenestrierung (Reynaert et al. 2001). In Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten wir, dass - obwohl durch die Vergrößerung des Abstandes zwischen Hepatozyten und dem vaskulären Netzwerk die sinusoidale Gefäßdichte nach der Resektion zunächst signifikant vermindert ist - eine konstante funktionelle Gefäßdichte durch die verbesserte Perfusion sowie Erweiterung der sinusoidalen Durchmesser bewahrt wird (Vogten et al. 2003; **Abshagen et al. 2006, 2008**; Budny et al. 2007). Dies gewährleistet auch unter Bedingungen reduzierter Lebermasse eine adäquate Perfusion und somit Sauerstoffversorgung des Organs (**Abshagen et al. 2006**) sowie die Aufrechterhaltung wichtiger metabolischer Funktionen (Budny et al. 2007).

### **2.3 Modelle und Techniken zur Analyse der Leberregeneration**

Grundlage für experimentelle Projekte zur Leberregeneration sind die chirurgischen Modelle der Resektion sowie der Voll- und Teillebertransplantation an der Ratte bzw. an der Maus. Aufgrund der einfachen Zucht von Mäusen und Ratten als auch der Verfügbarkeit optimaler immunologischer und molekularbiologischer Systeme werden diese Spezies für experimentelle Studien zur Leberregeneration bevorzugt.

In der klinischen Praxis wird die Leberregeneration infolge unterschiedlichster Leberschädigung beobachtet. Eine Bearbeitung der Fragestellung im Rahmen einer klinischen Studie ist aufgrund der vielen Faktoren, welche die Leberregeneration beeinflussen (Grunderkrankung, Komorbidität, Tageszeit, Patientenalter, bei Teillebertransplantation die Transplantatgröße, der Ischämie/Reperfusionsschaden, die postoperative Kombinations-Immunsuppression, Abstoßungsreaktionen usw.) nicht standardisierbar durchführbar und aufgrund der engmaschigen Probengewinnung ethisch nicht vertretbar. Somit sind nur relativ wenige Daten zur Leberregeneration verfügbar. Die meisten resultieren dabei aus volumetrischen oder laborchemischen Verlaufsuntersuchungen nach Leberresektion (Ibrahim et al. 2005), welche u.a. Leberfunktionstests (z.B. Indozyanin grün-Retentionsrate) und Messung der lebervenösen Sauerstoffsättigung einbeziehen. Ebenso kann die Fragestellung mittels *in vitro*-Versuchen nicht bearbeitet werden, da Zellkulturen zum jetzigen Zeitpunkt die *in vivo*-Situation nur ungenügend repräsentieren, und somit die komplexen Interaktionen zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen während der Leberregeneration nicht gut reproduziert werden können. Sie dienen lediglich zum Studium isolierter Signaltransduktionsprozesse, wie z.B. von Hepatozyten-Mitogenen (Palmes & Spiegel 2004). Experimentelle Tiermodelle zur Untersuchung der Leberregeneration bieten daher einen Kompromiss zwischen klinischer

Realität und experimenteller Vereinfachung des komplexen Prozesses. In der gesunden Leber ist die Zellproliferation ein seltenes Ereignis, nur etwa jede tausendste Leberzelle durchläuft den Zellzyklus (Court et al. 2002). Um nun eine Regenerationsantwort herbeizuführen, muss eine Leberschädigung induziert werden (Palmes & Spiegel 2004). Dabei muss der Auslöser der Leberschädigung unter standardisierten Bedingungen gesetzt werden, da die Ausprägung der Regenerationsantwort variieren kann (Diehl 1991).

Zur Induktion der Leberregeneration kommen mehrere Methoden in Frage. Dabei ist zwischen chirurgischen und hepatotoxischen Modellen sowie Modellen mit vorgeschädigter Leber zu unterscheiden (Abb. 3). Der Regenerationsmechanismus hängt dabei vom gewählten Leberschädigungsmodell ab. Die Schädigung des Lebergewebes muss ein gewisses Ausmaß besitzen. So ist bekannt, dass ein Gewebsverlust von mehr als 9-12% des Gesamtlebervolumens erforderlich ist, um den Schwellenwert einer regenerativen Antwort zu überschreiten (Yamanaka et al. 1993). Durch Reduktion funktioneller Lebermasse mit Hilfe der Leberteilresektion wird die Regeneration der verbleibenden Restleber induziert. Das bereits in den dreißiger Jahren entwickelte klassische Modell der 2/3 Hepatektomie an der Ratte durch Higgins und Anderson (1931) besitzt den Vorteil, dass es ein großes Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aufweist. Die entnommene Leber beträgt nach 2/3 Resektion annähernd immer 68% des Gewichtes der Ausgangsleber. Des Weiteren handelt es sich um eine relativ einfache Operation, die lediglich chirurgische Grunderfahrung voraussetzt (Rodriguez et al. 1999; Sakamoto et al. 2000; Greene & Puder 2003). Bei sachgemäßer Ausführung der Operation wird die 2/3 Leberresektion von Maus und Ratte ohne perioperative Mortalität toleriert. Weil die Regeneration bei Nagetieren bereits nach 7-15 Tagen abgeschlossen ist (Pistoi & Morello 1996; Michalopoulos & DeFrances 1997), bietet die PH ein optimales Zeitfenster zur Untersuchung des kompletten regenerativen Prozesses. In Bezug auf die Fragestellungen der vorliegenden Studien stellt dieses Modell ein ideales Werkzeug dar, da die Induktion der Leberregeneration zu einem Zeitpunkt stattfindet, von dem angenommen werden kann, dass sich „alle“ Hepatozyten im Ruhestadium befinden und zudem die KC nicht aktiviert sind. Die Induktion der Leberregeneration durch Hepatektomie führt zum zeitgleichen Eintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus. Da die DNA-Synthese schon 48 Stunden nach PH ein Maximum erreicht, liefert dieses Modell ein entsprechendes Zeitfenster zur Untersuchung der Interaktion der Parenchym- und Nichtparenchymzellen. Auf dieser Grundlage lässt sich adäquat die Wirkung verschiedenster Stoffe auf das Regenerationsverhalten der Leber überprüfen. Die im Abdomen verbleibende Restleber wird zum Zeitpunkt der Resektion nicht direkt geschädigt. Somit ist sie in der Lage, sich



zu regenerieren, ohne gleichzeitig nekrotischen oder inflammatorischen Prozessen ausgesetzt zu sein, wie es in Modellen mit vorgeschädigter Leber der Fall ist (Sakamoto et al. 2000). Auch eine Teillebertransplantation ist aufgrund dessen auszuschließen, da möglicherweise auftretende Noxen (Ischämie/Reperfusionsschaden, Rejektion) die Beantwortung der Fragestellung verfälschen können. Die Anatomie der Nagetierleber macht es weiterhin möglich, das Leberparenchym stufenweise bis zu 97% zu resektieren (Martins et al. 2008). Dadurch kann die Regeneration in klinisch relevanteren Modellen, wie den erweiterten Resektionen, untersucht werden.

Ein weiteres Verfahren, die Regeneration der Leber zu induzieren, stellt das Ligieren des linken Astes der Pfortader dar, wodurch im Kleintier etwa 70% der Leber von der portalen Blutversorgung unterbunden werden (Lambotte et al. 2000; Mueller et al. 2003). In dessen Folge kommt es zur Atrophie und Apoptose im okkludierten Leberlappen und zur kompensatorischen Hyperplasie in den nicht-okkludierten Leberlappen. Es handelt sich um ein unkompliziertes und, bei adäquater operativer Technik, einfach reproduzierbares Modell, welches im Gegensatz zur Leberteilresektion reversibel ist und zwei gegensätzliche Prozesse, Atrophie und Hyperplasie, in einem Tier vereint. Im Gegensatz zur PH lassen sich hier frühe molekulare Prozesse für die Leberregeneration bei konstantem Gesamtlebervolumen erforschen. Analog wird seit Anfang der neunziger Jahre das Modell der Pfortaderokklusion in der Klinik zur Vorbereitung von erweiterten Hemihepatektomien weltweit immer erfolgreicher eingesetzt (Broering 2002). Ähnlich wie bei der kompensatorischen Regeneration nach Leberteilresektion im Tier und im Menschen zeigt auch das Modell der Pfortaderokklusion, dass Lebervolumen und Ausmaß der Regeneration fein reguliert sind (Duncan et al. 1999). Es eignet sich jedoch eher zur Prüfung spezieller klinischer Probleme, wie z.B. des hepatotropen Effektes des Portalvenenblutes auf die Leberregeneration oder in Großtiermodellen zur Lösung technischer operativer Probleme.

Leberregeneration ohne Leberzellverlust wird als direkte kompensatorische Hyperplasie bezeichnet und wird durch die intravenöse Verabreichung von Bleinitrat hervorgerufen (Columbano & Shinozuka 1996). Da diese Methode im Vergleich zur Regeneration nach Leberteilresektion ein anderes Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nach sich zieht und in diesem Zusammenhang u.a. das Verhalten von TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha) nicht eindeutig geklärt ist, rückte die Anwendung dieser Methode in den Hintergrund (Kubo et al. 1996).

Bei Acetaminophen (Gardner et al. 2002), Tetrachlorkohlenwasserstoff ( $\text{CCl}_4$ ), D-Galaktosamin, Ethanol (Diehl 1999) und Thioacetamid (TAA) handelt es sich um Toxine, die Leberschädigung (Hepatitis) und Zelltod des Parenchyms hervorrufen können

(Rahman & Hodgson 2000). Sie werden in hepatotoxischen Modellen häufig angewendet, um eine experimentelle Leberregeneration zu induzieren. Während bei der Leberteilektomie die verbleibenden Leberazini intakt bleiben, können durch gezielten Einsatz der Hepatotoxine periportale und perizentrale Zellschäden hervorgerufen und so verschiedenste Lebererkrankungen simuliert werden (akutes Leberversagen, Leberfibrose und -zirrhose). Vorteile dieser Modelle sind, dass sie im Gegensatz zur Hepatektomie leichter durchzuführen und von beträchtlicher klinischer Relevanz sind, indem die Interaktion zwischen Zellschädigung und Zellregeneration untersucht werden kann. Nachteilig wirkt sich jedoch die geringe Reproduzier- und Standardisierbarkeit aus. Demzufolge können das Ausmaß des Leberschadens und der Regeneration beträchtlich variieren (Bolesta & Haber 2002). Weiterhin ist die regenerative Antwort der Leber in großem Maße von der Dosis sowie Art und Weise der Toxinapplikation abhängig. Außerdem können die Toxine *per se* direkten Einfluss auf die zellulären und molekularen Mechanismen der Leberregeneration besitzen. In einigen dieser hepatotoxischen Modelle sind aktivierte KC durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Sauerstoffradikale sowie der Aktivierung neutrophiler Granulozyten maßgeblich an der Aggravierung des Leberschadens beteiligt.

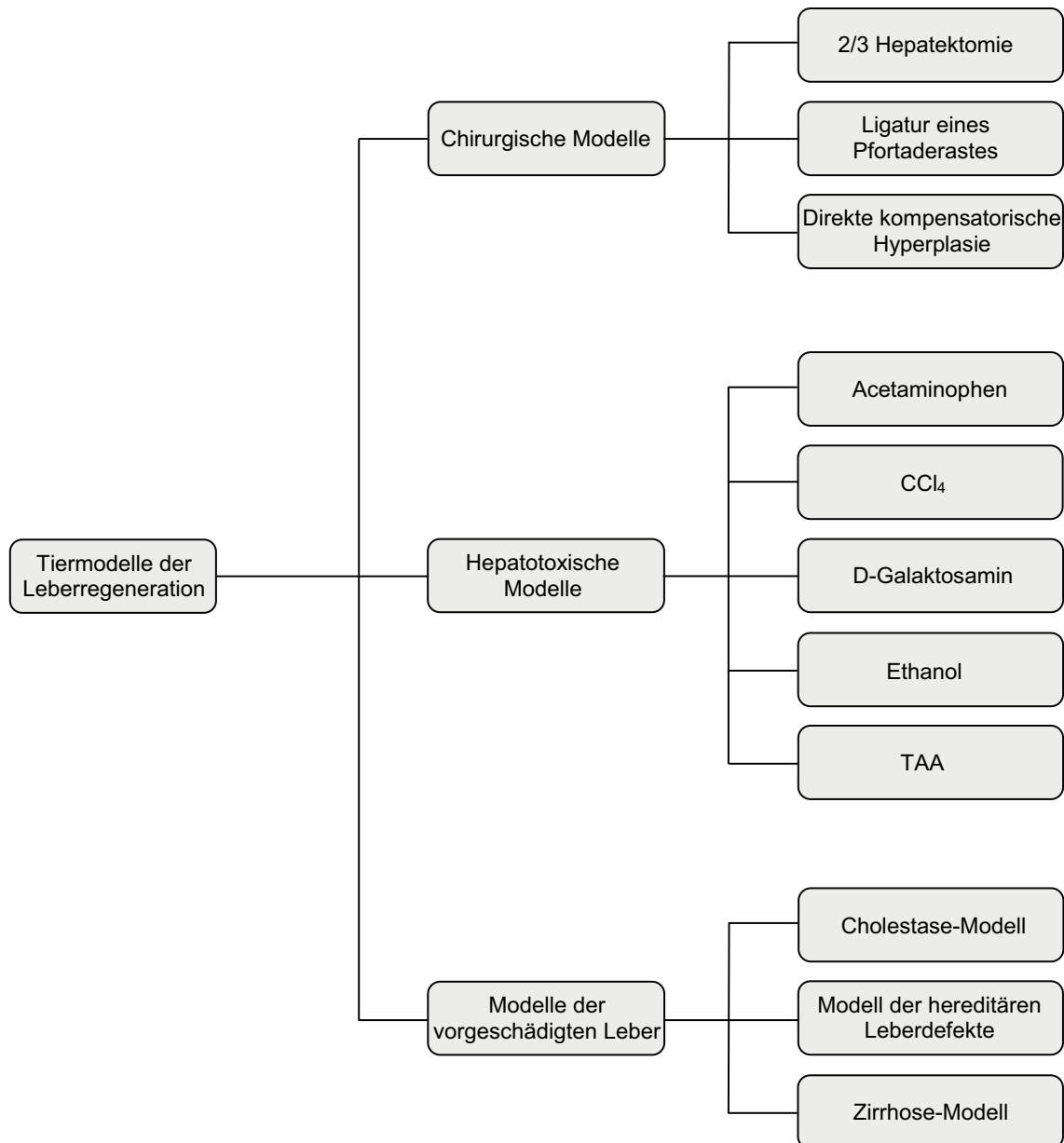
Mit der akuten CCl<sub>4</sub>-Schädigung bei Nagetieren steht uns ein Modell zur Verfügung, welches einer akuten Leber-Intoxikation beim Menschen ähnelt. Hierbei wird ein akuter, reversibler Leberschaden durch eine einmalige intraperitoneale Gabe von CCl<sub>4</sub> induziert (Bruccoli et al. 1997). Diese Form des Leberschadens ist durch zentrilobuläre Nekrosen charakterisiert, gefolgt von einer kompletten Regeneration, wobei in diesen CCl<sub>4</sub>-geschädigten Lebern die Zellzyklus-Antwort der Hepatozyten nicht zeitgleich verläuft (Liu et al. 1993; Koniaris et al. 2003).

Da der Aminosäure D-Galaktosamin ausschließlich in der Leber metabolisiert wird, führt dessen Applikation zur selektiven Depletion von Uridinnukleotiden und folglich zur Transkriptions- und Translationsblockade in der Leber (Decker & Keppler 1972). Im Vergleich zur CCl<sub>4</sub>-Schädigung ist die D-Galaktosamin-induzierte regenerative Antwort deutlich schwächer. Ein weiterer Nachteil des D-Galaktosamin-induzierten Leberschadens (Koniaris et al. 2003) ist, dass die replikative Kapazität der meisten Hepatozyten durch D-Galaktosamin selber vermindert wird, so dass Leberpräkursorzellen, sogenannte Ovalzellen, proliferieren müssen, um den Parenchymverlust auszugleichen (Dabeva & Shafritz 1993). Daher eignet sich dieses Modell eher zur Induktion eines akuten Leberversagens (Eipel et al. 2007) als zur Analyse des Regenerationsprozesses.

Häufige Ursache eines akuten Leberversagens ist die Intoxikation mit Acetaminophen (Paracetamol) (Bolesta & Haber 2002). Im Tiermodell induziert eine einmalige hoch-



dosierte Gabe von Acetaminophen einen akuten reversiblen Leberschaden, begleitet von massiver hepatozellulärer Apoptose. Der Effekt von Ethanol, als eine der häufigsten Gründe für Leberzirrhose, auf die Leberregeneration wurde schon mehrfach untersucht, führte jedoch aufgrund variierender Studiendesigns zu kontroversen Ergebnissen. TAA ist ein weiteres Hepatotoxin, welches zur Induktion von Leberzirrhose oder akuter hepatischer Enzephalopathie dient.



**Abb.3.** Tiermodelle der Leberregeneration (nach Palmes & Spiegel 2004); TAA (Thioacetamid), CCl<sub>4</sub> (Tetrachlorkohlenwasserstoff)

Obwohl viele Modelle zur Leberzirrhose bestehen, ist die Leberregeneration in Tiermodellen mit vorgeschädigter Leber bisher noch unzureichend erforscht. In Abhängigkeit vom Insult können die zirrhotischen Modelle in toxische ( $\text{CCl}_4$ , TAA, etc.), ernährungsbedingte (Diät aus viel Fett und wenig Protein), immunologische (Endotoxine), biliäre (Gallengangsligatur), alkoholische und genetische Modelle gegliedert werden. Des Weiteren existieren eine Reihe von Tiermodellen zur Untersuchung humaner erblicher (hereditärer) Leberdefekte, wie z.B. die „Gunn Ratte“ als Modell des Crigler-Najjar-Syndrom I (Cornelius & Arias 1972) oder die „Nagase Albumin-defiziente Ratte“ (Nagase et al. 1979). Weitere Untersuchungen, insbesondere vergleichbare Studien zwischen Toxin-induzierter und chirurgisch-induzierter Leberregeneration in gesunden als auch in vorgeschädigten Lebern sind notwendig, um unser Wissen über die Mechanismen der Leberregeneration effizienter in Behandlungen von Lebererkrankungen einzubringen, und um Fortschritte auf dem Gebiet des ‚Hepatic Tissue Engineering‘ zu erreichen.

Bereits in der Mitte des 17. Jahrhunderts begann die direkte Darstellung der Morphologie und Mikrozirkulation in verschiedenen Organen sowohl am Tier als auch am Menschen. Zum heutigen Zeitpunkt erlaubt die moderne intravitale Multifluoreszenzmikroskopie (IVM) die Visualisierung und quantitative Analyse lebender Zellen und ihrer dynamischen Wechselwirkungen innerhalb der Mikrozirkulation (Messmer & Krombach 1998) und stellt somit eine adäquate Methode dar, die Leberregeneration zu beurteilen. Die fortschreitende Entwicklung der Technik hat nicht nur zur Verbesserung der Bildqualität, sondern auch zur Erweiterung des Spektrums intravitalmikroskopischer Analysen beigetragen. So ist es mit Hilfe dieses Verfahrens möglich, physiologische und pathophysiologische Prozesse in Organen wie Leber, Niere, Darm, Lunge, Synovia etc. darzustellen (Kuebler et al. 2000; Veihelmann et al. 2001). Die Technik der IVM kann in Transillumination und in Epiillumination durchgeführt werden. Bei der in den vorliegenden Studien gewählten Epifluoreszenzmethode wird die oberflächliche hepatische Morphologie und Mikrozirkulation beurteilt (**Abshagen et al. 2006, 2007, 2008**). Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, große Flächen der Leber zu betrachten. Dabei geht man davon aus, dass die Beobachtungen repräsentativ für das gesamte Organ sind, da es prinzipiell keine Unterschiede in der Morphologie oberflächlicher und tiefer Leberläppchen gibt. Selbstverständlich ist eine standardisierte Versuchsdurchführung Voraussetzung für eine erfolgreiche Untersuchung. Einflüsse durch Manipulation während der Operation bzw. der Auslagerung der Leber sind zu vermeiden, da jede Beeinträchtigung zur Alteration der hepatischen Mikrozirkulation führt. Demgegenüber steht die Transillumination, die lediglich zur Untersuchung dünner Gewebeabschnitte der Leber genutzt werden kann und

somit das zur Verfügung stehende Areal auf eine 0,5-1 mm breite Zone am Rand der Leberlappen begrenzt (Baatz et al. 1995). Diese Randbereiche sind besonders empfindlich gegenüber mechanischer Schädigung. Zudem wird nur ein kleines Areal erfasst, welches gegebenenfalls nicht repräsentativ für das gesamte Organ ist. Unter Verwendung spezieller Filtersätze im Mikroskop können mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe selektiv verschiedene Gewebekompartimente (Zellen, Plasma) dargestellt werden. Dies ermöglicht eine direkte und simultane Visualisierung der einzelnen anatomischen Strukturen auf mikrozirkulatorischer Ebene (Menger et al. 1991; Menger & Lehr 1993). Die Verfügbarkeit verschiedenartiger Fluoreszenzmarker für die *ex vivo*- und *in vivo*-Färbung hat die Möglichkeiten der IVM von der rein morphologischen Analyse zur Untersuchung komplexer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse erweitert (Menger & Lehr 1993).

Fluoreszenzfarbstoffe sind Moleküle, die durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und daraufhin Licht längerer Wellenlänge emittieren. Für die IVM der Leber stehen u.a. Natriumfluoreszein, Bisbenzimid H33342, Rhodamin-6G, FITC- (Fluoreszein-isothiozyanat) markierte Substanzen, Propidiumjodid und fluoreszenzmarkierte Latex Beads zur Verfügung. Durch die Applikation von Natriumfluoreszein mit anschließender rascher Diffusion ins Parenchym können Sinusoide als dunkle Bereiche und Hepatozytenstränge als helle Areale dargestellt werden. Zur quantitativen Bestimmung mikrohämodynamischer Parameter, wie z.B. der mittleren Gefäßweite oder der funktionellen Kapillardichte ist diese Färbung demnach ideal geeignet und wurde somit in den vorliegenden Arbeiten verwendet. Vollmar et al. haben 1996 eine neue Methode der Hepatozytenmarkierung eingeführt: Bisbenzimid H33342 ist einfach zu verabreichen und erlaubt in den vorliegenden Versuchen eine schnelle und exakte intravitalmikroskopische Analyse der Hepatozytenanzahl bzw. hepatozellulärer Kerne. Ebenso können apoptotische Hepatozyten charakterisiert werden, welche sich - aufgrund von Kondensation und Fragmentation des Chromatins - nach Anfärbung mit dem Farbstoff durch stärkeren Kontrast und veränderter Kernmorphologie von vitalen Hepatozyten abgrenzen (Schäfer et al. 2003; El-Gibaly et al. 2004). Obwohl zur Zeit nur wenige Arbeiten über die Aktivierung und Morphologie der Ito-Zellen in der sich regenerierenden Leber vorhanden sind, ist deren Beteiligung an der Leberregeneration unbestritten (Balabaud et al. 2004). Da Ito-Zellen aufgrund ihrer Vitamin-A-Einlagerung eine helle, schnell verblassende Autofluoreszenz aufweisen, benötigt man zu deren intravitalmikroskopischen Darstellung keinen speziellen Fluoreszenzfarbstoff (Mabuchi et al. 2004; **Abshagen et al. 2006**). Weiterhin können mittels IVM zelluläre Interaktionen, wie z.B. die endotheliale Leukozyten-Adhärenz nach Applikation von Rhodamin-6G (Zeintl et al. 1989;

Vollmar et al. 1994a) bzw. die Interaktionen von Thrombozyten (Lehr et al. 1999; Eipel et al. 2004), oder die Funktion (Phagozytose) von KC durch die Injektion fluoreszierender Latexpartikel (Post et al. 1992; Vollmar et al. 1994b; **Abshagen et al. 2007, 2008**) analysiert werden. Auch Veränderungen der Gefäßpermeabilität sowie zellulärer Transport und Integrität können unter Verwendung der IVM beurteilt werden (Menger & Lehr 1993). Nach Aufnahme der Bilder auf Videoband erfolgen sämtliche Analysen zellulärer und mikrozirkulatorischer Parameter off-line, wodurch der Beobachtungszeitraum des Versuches auf ein Minimum reduziert wird. Ein möglicher phototoxischer Effekt wird auf diese Weise weitestgehend vermieden. Aus den Daten (z.B. Regenerationsparameter, Serumchemie) der Kontrollgruppen sowie anderer experimenteller Studien lässt sich schließen, dass die gewählten Farbstoffe und Operations- bzw. Untersuchungstechniken einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Regeneration bzw. Leberfunktion besitzen. Somit stellt die IVM eine angemessene Methode zur Untersuchung der Leberregeneration dar.

Beim Menschen kann diese Methode aufgrund der Notwendigkeit der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die selbst in hohen Konzentrationen direkt toxisch sind oder phototoxische Reaktionen hervorrufen, nicht angewendet werden. Mit der orthogonalen Polarisations-Spektrophotometrie (orthogonal polarization spectral (OPS)-imaging) (Groner et al. 1999) ergibt sich die Möglichkeit einer direkten Visualisierung und Quantifizierung der Mikrozirkulation am Menschen. Ähnlich der IVM erfolgt die Darstellung der Mikrozirkulation durch Epiillumination, kommt aber im Gegensatz zur IVM ohne Applikation toxischer oder phototoxischer Fluoreszenzfarbstoffe aus. Als nachteilig im Vergleich zur IVM muss allerdings die Tatsache genannt werden, dass sich die Untersuchung der Mikrozirkulation auf die vaskulären Parameter, welche durch den Erythrozytenfluß, der vor dem nahezu farblosen Hintergrund schwarz hervortritt, sichtbar sind, beschränkt. Eine Beurteilung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, die ebenfalls eine herausragende Stellung in der Pathogenese und Beurteilung einer Mikrozirkulationsstörung einnehmen, ist durch diese Technik nicht möglich (Groner et al. 1999).

Zur Analyse des mikrovaskulären Strombetts stehen auch indirekte Methoden zur Verfügung: Zu diesen Untersuchungstechniken werden beispielsweise die Photoplethysmographie (Webster & Patterson 1976), die transkutane Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (Keller & Lanz 1984), die Thermographie (Leonard et al. 1982) oder die Laser-Doppler-Flussmessung (Arvidsson et al. 1988) gerechnet. Mit diesen Methoden ist es jedoch nicht möglich, mikrozirkulatorische Vorgänge in den einzelnen Segmenten des mikrovaskulären Netzwerkes - wie z.B. in den terminalen Arteriolen und in den postkapil-

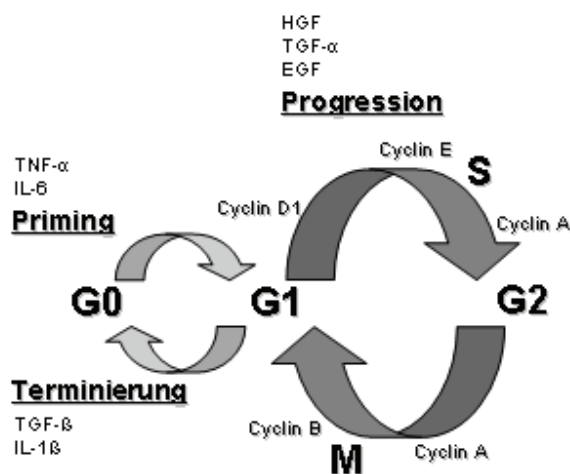
laren Venolen - getrennt zu betrachten. Darüber hinaus gestatten diese Untersuchungstechniken keine Analyse von zellulären Interaktionen zwischen Leukozyten, Thrombozyten und EC (Menger & Vollmar 1994). Die eindeutigen Vorteile der IVM gegenüber den o.g. indirekten Untersuchungsmethoden führten zur breiten Verwendung dieser Technik bei der Analyse der Mikrozirkulation in unterschiedlichsten Organen und Geweben, wie z.B. im Pankreas (Hoffmann et al. 1995), in der Muskulatur, in der Haut (Menger & Vollmar 1994) und in der Leber (Menger et al. 1991; Uhlmann et al. 1999).

Zusätzlich zur *in vivo*-Mikroskopie kann die Leberregeneration mittels Standard-*in vitro*-Methoden auf zellulärer und molekularer Ebene (molekularbiologische, zellbiologische, histologische, immunhistochemische Untersuchungen) charakterisiert werden, was die Asservierung des Lebergewebes zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt nach PH erfordert. Diese Analysen beinhalten z.B. das Lebergewicht, Syntheseraten, verschiedene Protein-Level, spezifische Enzymmarker (Transaminasen), Mitose-Index, DNA-Messungen und Genexpressionsanalysen (Assy & Minuk 1997).

### 3 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Leberregeneration

#### 3.1 Stadien der Leberregeneration

Die Hepatozytenproliferation ist gekennzeichnet durch drei Phasen: i) eine ‚*Priming*‘ Phase, in welcher die Hepatozyten in ein Stadium replikativer Kompetenz eintreten, ii) eine *Proliferationsphase*, in welcher sich die Zellpopulation vergrößert und iii) eine *Terminationsphase*, in welcher das Zellwachstum zu einem bestimmten Zeitpunkt gestoppt wird (Abb. 4).



**Abb.4.** Drei-Phasen-Modell der Leberregeneration und schematische Darstellung des Zellzyklus von Hepatozyten.

Nach der Leberschädigung verlassen die Hepatozyten ihren Ruhezustand (G0-Phase) und treten in die proliferativen Stadien des Zellzyklus ein. Insgesamt handelt es sich bei der Initiation der Leberregeneration um eine modifizierte akute Phase Reaktion, bei der Nichtparenchymzellen, vor allem KC, eine zentrale Rolle spielen. In den ersten 4 Stunden nach PH werden die KC u.a. durch aktivierte EC stimuliert, vasoaktive Mediatoren und Zytokine zu sezernieren, welche neben einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auch das sogenannte ‚*Priming*‘ der Hepatozyten bewirken. Durch knockout Tiere konnte eine Beteiligung von Komplement-Komponenten wie C3a und C5a an der Initiation der Regeneration und Produktion von initialen Zytokinen untersucht werden (Strey et al. 2003). Durch die im Rahmen der Schädigung freigesetzten ‚*Priming*‘-Faktoren, wie TNF-α, IL-6 und NO (Stickstoffmonoxid), werden die Hepatozyten gegenüber den Einflüssen von Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, EGF, TGF-α) sensibilisiert (Koniaris et al. 2003). Dabei besitzen Hepatozyten auch die Möglichkeit ohne ‚*Priming*‘-Faktoren nur unter dem

Einfluss von Wachstumsfaktoren in einem geringeren Maße DNA-Synthese durchzuführen, z.B. wenn kein Schädigungsreiz vorliegt. Kommt es jedoch durch eine Leberschädigung zur Freisetzung von ‚Priming‘-Faktoren, so werden die Hepatozyten gegenüber den Einflüssen von Wachstumsfaktoren erheblich stärker sensibilisiert (Koniaris et al. 2003). So zeigte Webber et al. (1998), dass die proliferative Antwort auf HGF durch vorherige Behandlungen mit TNF- $\alpha$  signifikant erhöht ist. Es kommt zum Übertritt der Zelle vom Ruhezustand in die präreplikative Phase. Verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappaB) und AP-1 (Activator Protein-1), werden aktiviert, was zur Expression von ‚immediate-early‘ Genen in den Hepatozyten (z.B. c-fos, c-jun, c-myc, JunB, Cyclin, Cyclin-abhängige Kinasen) und schließlich zur DNA-Replikation und Zellproliferation führt (Fausto 2001). Die Aktivierung und Expression dieser Transkriptionsfaktoren in den ersten 4 bis 6 Stunden nach PH korreliert mit der Progression des Zellzyklus von der G0- in die G1-Phase. Genexpressionsanalysen identifizierten ca. 185 frühe Gene, wie Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusgene sowie Gene, die an der Signaltransduktion, der Inflammation und dem EZM-Remodelling beteiligt sind (Su et al. 2002). Im Gegensatz dazu wird die Transkription von Lipiden und Hormonen vermindert (White et al. 2005). Sobald der Hepatozyt das ‚Priming‘ durchlaufen hat, ist die Weiterentwicklung zur G1- und S-Phase abhängig von der Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren. Dabei ist der Effekt der Wachstumsfaktoren kurzzeitig und die Wirkungsweise abhängig vom metabolischen Zustand des Hepatozyten. Bleibt diese Stimulation aus, so ist das ‚Priming‘ reversibel und die Zelle tritt wieder in den Ruhezustand ein. In der präreplikativen Phase (G1-Phase) erfolgen die Duplizierung notwendiger Zellkomponenten und die Synthese neuer proliferationspezifischer Moleküle. In Abhängigkeit von o.g. Wachstumsfaktoren wird in der nachfolgenden Synthesephase (S-Phase) dann die DNA repliziert. Durch die Wachstumsfaktoren wird die Zellzyklus-Progression der Hepatozyten eingeleitet, indem sie die Expression und Aktivierung von ‚delayed‘ Genen, welche für die DNA-Synthese und Mitose benötigt werden, induzieren. Anschließend erfolgt die postreplikative Phase (G2-Phase), in der die Zelle Moleküle synthetisiert, die zur nachfolgenden Zellteilung (Mitose, M-Phase) benötigt werden. Nach ein oder zwei Runden der Replikation verlassen die Hepatozyten den Zellzyklus und treten wieder in den Ruhezustand (G0-Phase) ein (Taub 2004; Fausto et al. 2006).

Die Terminierung der Leberregeneration wird über das präzise Zusammenspiel von Stimulatoren und Inhibitoren gesteuert und setzt ein, wenn die erforderliche funktionelle Kapazität wieder hergestellt ist und den metabolischen Anforderungen der Leber genügt.

Die Mechanismen, die zur Beendigung der Leberregeneration beitragen, sind allerdings weniger gut als die Signale der Initiation untersucht. Bisher wurden einige Signale identifiziert, die möglicherweise bei der Regulierung der exakten Lebergröße bzw. der Limitierung der Regeneration - unter anderem auch in Abhängigkeit vom Bedarf des Gesamtorganismus - beteiligt sind. So hat zum Beispiel die Deletion von p27, einem Cyclinkinase-Inhibitor, eine Erhöhung des relativen Lebergewichts zur Folge. In Analogie dazu, führt die Deletion von Cyclin D1 zu einem verminderten relativen Lebergewicht (Albrecht et al. 1998). Weitere Faktoren, die bei der Limitierung der Regeneration wichtig sein könnten, stellen Suppressoren der Zytokinwirkung, sogenannte SOCS (suppressor of cytokine signalling) dar. So wird durch IL-6 unter anderem auch die Bildung und Freisetzung von SOCS3 hochreguliert. Diese Hochregulation kann im Sinne eines negativen Feedbacks wiederum das IL-6 Signal terminieren (Campbell et al. 2001). Gleichzeitig werden durch SOCS3 auch andere Zytokinwirkungen und somit möglicherweise auch die Leberregeneration blockiert. Der Prozess der Apoptose in Hepatozyten spielt während der Leberregeneration nach PH eine untergeordnete Rolle, lässt sich zum Ende des Regenerationsprozesses aber als eine Art Reparaturmechanismus interpretieren, wodurch überflüssige Hepatozyten eliminiert werden (Taira et al. 2001; **Abshagen et al. 2006**). So beobachteten wir eine leicht erhöhte apoptotische Zellzahl an Tag 5 nach PH, also zum Zeitpunkt bereits abgeschlossener hepatozellulärer DNA-Synthese (**Abshagen et al. 2006**). Untersuchungen zur EZM lassen vermuten, dass durch den Wiederaufbau der EZM und des sinusoidalen Kapillarnetzes Matrix-spezifische Signalwege induziert werden, welche die Terminierung des regenerativen Prozesses direkt via Integrine oder indirekt via TGF- $\beta$  oder Bindung von HGF stimulieren können (Michalopoulos 2007) und somit die Hepatozyten wieder in ihren Ruhezustand zurückkehren. Der am besten untersuchte antiproliferative Faktor ist TGF- $\beta$ , welcher vornehmlich von KC und Ito-Zellen zum Zeitpunkt geringer DNA-Synthese produziert wird. TGF- $\beta$  hemmt *in vitro* die Hepatozytenproliferation (Carr et al. 1986), dagegen weisen Hepatozyten *in vivo* während der Frühphase der Leberregeneration eine TGF- $\beta$  Resistenz auf und proliferieren trotz erhöhter TGF- $\beta$  Konzentrationen (Koniaris et al. 2003). Wird im Zuge der Leberregeneration die erforderliche funktionelle Kapazität und die physiologische Lebermasse wiederhergestellt, so werden die Hepatozyten wieder gegenüber dem Einfluss der Inhibitoren TGF- $\beta$  und Activin A sensibel (Kountouras et al. 2001; Koniaris et al. 2003). Zusätzlich aktiviert TGF- $\beta$  auch Smad-Proteine, die beim Übertritt in die Nicht-Proliferationsphase eine Rolle zu spielen scheinen (Macias-Silva et al. 2002). Dagegen haben Boulton et al. (1997) IL-1 $\beta$  aufgrund seiner mito-inhibitorischen Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* eine signifikante Funktion als Inhibitor der



hepatozellulären DNA-Synthese zugeordnet. Dies impliziert, dass TGF- $\beta$  neben IL-1 $\beta$  nur alternative oder ergänzende Funktionen ausübt. Insgesamt ist die Rolle von TGF- $\beta$  und IL-1 $\beta$  bei der Beendigung der Leberregeneration bisher nicht vollständig geklärt, ebenso wie die exakten Mechanismen, die zum Wachstumsstillstand beitragen.

### 3.2 Zellzyklus

Auch bei der Leberregeneration stellt der Zellzyklus zunächst der Hepatozyten und später der Nichtparenchymzellen den zentralen Punkt dar, auf dessen Ebene sich die meisten Störungen der Leberregeneration manifestieren. Unmittelbar nach der Zellschädigung treten annähernd 95% der ruhenden Hepatozyten, hervorgerufen durch den Einfluss von Mitogenen und Co-Mitogenen, wieder in den Zellzyklus ein. Während des Regenerationsprozesses nach 70%-iger Leberresektion durchläuft jeder Hepatozyt den Zellzyklus rechnerisch ca. 1,6 mal (Taub 2004). Nach der Stimulation der Hepatozyten verlassen diese ihr Ruhestadium (G0-Phase) und treten in die proliferativen Stadien des Zellzyklus ein (Abb. 4). Bereits 1962 beschrieb Grisham, dass die Zellproliferation nach PH semi-synchron verläuft (Grisham 1962), beginnend mit den Parenchymzellen, welche die Portalvene des Leberläppchens umgeben (höchste Proliferationsaktivität) (Skullman et al. 1990). Die DNA-Synthese schreitet in Hepatozyten in Richtung Zentralvene, mit einem Maximum 24 Stunden nach PH, fort. Ob dieser abnehmende Gradient hepatozellulärer DNA-Synthese von periportal nach perizentral aus alternierenden periportalen Hepatozyten (Zajicek et al. 1985) oder dem natürlichen Gradienten hepatotropher Faktoren resultiert (Black et al. 2004a), ist bisher noch ungewiss.

Die präreplikative Phase (G1-Phase) dauert ungefähr 12-15 Stunden an. In dieser Phase erfolgen die Duplizierung notwendiger Zellkomponenten und die Synthese neuer proliferationsspezifischer Moleküle zur Vorbereitung der DNA-Synthese. In der S-Phase (Synthesephase), d.h. bei Ratten etwa 12-16 Stunden nach PH, beginnt die DNA-Synthese, die ihr Maximum an Aktivität 22-24 Stunden nach Resektion erreicht. Obwohl die zeitliche Abfolge der Initiation der Leberregeneration in Ratten und Mäusen ähnlich ist, verläuft die DNA-Replikation in Ratten aufgrund einer kürzeren G1-Phase schneller als in Mäusen (24 Stunden versus 40-48 Stunden in Mäusen) (**Abshagen et al. 2007**). Die Moleküle, welche die Zelle zur Teilung benötigt, werden in der postreplikativen bzw. prämitotischen Phase (G2-Phase) synthetisiert. Ca. 6-8 Stunden nach DNA-Synthese erfolgt die Mitose bzw. Zellteilung (M-Phase) der Hepatozyten, wodurch zunächst Hepatozyten-Cluster entstehen. Ein Zellzyklus dauert bei Säugetierzellen etwa 22 bis 24 Stunden. Da nicht alle Zellen synchron den Zellzyklus durchlaufen, stellen sich bei der

Zellzyklusanalyse unterschiedliche Proliferationsphasen dar. Die meisten Zellen befinden sich in der G1-Phase, da diese zeitlich am längsten dauert, gefolgt von der etwas kürzeren S-Phase. Relativ wenige Zellen befinden sich in der wesentlich kürzeren G2-Phase und nur einige vereinzelte Zellen in der kürzesten Phase, der Mitose-Phase.

Der Übergang zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen wird durch verschiedene Cycline und deren Assoziation mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) sowie durch die Passage sogenannter Restriktionspunkte gesteuert. Cyclin D1 ist das geschwindigkeitslimitierende Cyclin bei der Progression der frühen G1-Phase. Neben teilweise mit Cyclin D1 überlappender Funktion ist Cyclin E vor allem für den Übertritt in die S-Phase notwendig. Der Restriktionspunkt hierfür befindet sich in der späten G1-Phase. Nach Durchlaufen dieses Restriktionspunktes findet unwiderruflich die Duplikation der gesamten DNA statt. Durch Cyclin/CDK-vermittelte Aktivierung des Retinoblastom Tumor Suppressor Proteins (Rb) kommt es zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F) und zur Zellzyklusprogression in die S-Phase. In der S-Phase spielt vor allem Cyclin A eine wichtige Rolle, da es für die DNA-Replikation essentiell ist. Ein zweiter Restriktionspunkt findet sich dann in der späten G2-Phase, der den Übertritt in die M-Phase regelt. Während der Mitose ist vor allem Cyclin B wichtig, da es für den Eintritt in die Mitose benötigt wird, wohingegen seine Degradation wiederum Voraussetzung für die Progression nach der Anaphase ist. Die Restitutionsphase ist gekennzeichnet durch den Einfluss von Mitoseinhibitoren, welche die Häufigkeit und das Ausmaß der Mitosewellen reduzieren (Pestell et al. 1999). Diese Faktoren sind zu Beginn der Proliferationsphase geblockt, werden aber zum Ende des Regenerationsprozesses wieder aktiv und helfen, die Hepatozyten in ihren ursprünglichen Ruhezustand zurückzusetzen.

Als Transkriptionsfaktor für Cyclin D1 oder Cyclin E fungierend ist NF- $\kappa$ B vor allem an der Zellzyklus-Progression von der G1- zur S-Phase beteiligt (Hinz et al. 1999; Guttridge et al. 1999). Neben der Bedeutung bei der Initiation der Regeneration konnte NF- $\kappa$ B auch als wichtiges Schlüsselement bei der Progression von der S- zur G2/M-Phase identifiziert werden (Black et al. 2004b). So beobachteten Iimuro et al. (1998) als Folge der Inhibition von NF- $\kappa$ B eine verminderte hepatozelluläre Mitoserate nach PH, welche jedoch nicht von reduzierter DNA-Synthese begleitet war. Ebenso konnten wir in KC-depletierten Mäusen eine eingeschränkte Leberregeneration beobachten, welche von normaler DNA-Synthese, aber reduzierter NF- $\kappa$ B Aktivität und geringerer Expression des M-Phase spezifischen Proteins Cyclin B1 begleitet war (**Abshagen et al. 2007**). Unsere Daten lassen vermuten, dass infolge der 70%-igen Resektion KC-spezifisches NF- $\kappa$ B an der Regulation des Überganges von der S- zur G2/M-Phase des Zellzyklus beteiligt ist (**Abshagen et al. 2007**).

Die Regeneration der Nichtparenchymzellen, wie z.B. von sinusoidalen EC, ist noch weitgehend unbekannt. Ihr Proliferationszyklus unterliegt einem anderen Zeitmuster als der von Hepatozyten. Sie folgen ihnen einen Tag später mit der Proliferation (Ogawa et al. 1979). Die Replikation der Nichtparenchymzellen beginnt mit der Vermehrung der Gallengangsepithelzellen, gefolgt von der Replikation der KC, der Ito-Zellen und zuletzt der sinusoidalen EC (Michalopoulos & DeFrances 1997; Markus et al. 2000). Sowohl durch ihre hohe selbst-replikative Kapazität als auch durch Proliferation und Differenzierung intrahepatischer Makrophagen-Vorläufer sind während der späten Regenerationsphase vermehrt KC zu beobachten (Bouwens et al. 1984).

### **3.3 Zytokine / Wachstumsfaktoren / Transkriptionsfaktoren (humorale Faktoren)**

Die kompensatorische Leberregeneration nach PH ist ein komplex regulierter Prozess, welcher einer Vielzahl extra- und intrazellulärer Steuermechanismen unterliegt. Bereits innerhalb weniger Minuten nach PH kommt es zur verstärkten Transkription zahlreicher Gene, die in der ruhenden Leber nicht oder nur basal exprimiert werden. Diesen ‚immediate-early‘ Genen wird eine entscheidende Bedeutung für die transkriptionelle Steuerung des Wiedereintritts der Zellen in den Zellzyklus zugeschrieben. Weiterhin gehören zu den molekularbiologischen Mechanismen und Regelkreisen, die den Zellteilungsprozess der Leberregeneration steuern, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die mitogen oder co-mitogen auf den hepatischen Zellpool wirken. Molekularbiologisch zeigt sich diese Sensibilisierung durch ‚Priming‘ in Form einer Genaktivierung, wodurch es innerhalb weniger Minuten nach PH zur Expression von ca. 70 frühen Genen kommt (Fausto 2001; Kountouras et al. 2001). Zu diesen Genen gehören u.a. Proto-Onkogene und Gene, welche die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Diese Transkriptionsfaktoren, die durch ihre Aktivierung eine erhöhte Bindungsaktivität an die DNA besitzen, regulieren die Expression von Genen, die wiederum für die Zellproliferation verantwortlich sind (Kountouras et al. 2001). Das Zusammenspiel dieser Faktoren stimuliert die überlebenden Hepatozyten zur Proliferation (Taub 2004).

TNF- $\alpha$  wird als ein entscheidendes Zytokin während der Initiationphase des Regenerationsprozesses diskutiert (Webber et al. 1998). Obwohl TNF- $\alpha$  auch von biliären Epithelzellen und venösen EC produziert wird, sind die nach PH sehr schnell ansteigenden hepatischen TNF- $\alpha$  Konzentrationen maßgeblich von der KC-Funktion abhängig (Iwai et al. 2001). Die genauen Mechanismen, welche die initiale Erhöhung der TNF- $\alpha$  Konzentration nach PH steuern, sind bisher noch unklar. Als ein möglicher Trigger

wird das im Darm produzierte LPS (Lipopolysaccharid) gram-negativer Bakterien diskutiert. So konnten sowohl in keimfreien Mäusen als auch in Mäusen, welche defizient für MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) - einem intrazellulären Signalmolekül für LPS/TLR (Toll-like-Receptor) - sind, eine eingeschränkte Leberregeneration, assoziiert mit verminderten TNF- $\alpha$  und IL-6 Konzentrationen, beobachtet werden (Cornell 1985; Seki et al. 2005; Fausto et al. 2006; Hata et al. 2007). Die mitogene Wirkung von TNF- $\alpha$  auf Hepatozyten wurde in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt (Diehl et al. 1994), obgleich paradoxerweise zytotoxische Effekte in anderen Situationen, wie z.B. dem akuten Leberversagen, beschrieben sind (Leist et al. 1995). Experimente mit neutralisierenden anti-TNF $\alpha$  Antikörpern führten aufgrund der Inhibition hepatozellulärer DNA-Synthese zu der Hypothese, dass dieses Zytokin von großer Bedeutung für die Leberregeneration ist (Akerman et al. 1992; Diehl et al. 1994). Diese Blockierungsexperimente resultierten in einer verminderten Aktivität der JNK (c-Jun N-terminal Kinase), einer verminderten Induktion von c-Jun als einen essentiellen Faktor für die Leberregeneration (Westwick et al. 1994), und einer verminderten DNA-Bindungsaktivität von AP-1 (Diehl et al. 1994). Obwohl TNF- $\alpha$  an Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren bindet, ist für eine normale Leberregeneration nur der TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) von Bedeutung (Yamada et al. 1997, 1998). Die deutlich eingeschränkte DNA-Synthese nach PH in TNFR1 knockout Mäusen war mit niedrigen IL-6 Konzentrationen assoziiert und von einer stark verminderten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und STAT3 sowie einer erhöhten Mortalität begleitet (Yamada et al. 1997). Im Gegensatz dazu ließen Experimente mit TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen keine Korrelation von TNF- $\alpha$  und der Regenerationskapazität der Leber erkennen (Hayashi et al. 2005). Zudem kann TNF- $\alpha$  die Leberzellproliferation auch indirekt über die Aktivierung anderer Faktoren modulieren. Einer der intrazellulären TNF- $\alpha$ -abhängigen Signalwege, welcher zur Induktion von anti-apoptotischen Mechanismen und zur IL-6 Expression führt, ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Trautwein et al. 1996). Die NF- $\kappa$ B-abhängige Induktion anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) und Bcl-x<sub>L</sub> (B-cell lymphoma-x<sub>L</sub>), schützt die Hepatozyten vor den möglichen toxischen Effekten erhöhter Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und reaktiven Sauerstoffspezies während der Initialisierungsphase. Der proliferative Effekt auf die Hepatozyten nach PH resultiert somit aus folgender Sequenz (Fausto 2000, 2001):

TNF- $\alpha$ $\Longrightarrow$ TNFR1 $\Longrightarrow$ NF- $\kappa$ B $\Longrightarrow$ IL-6 $\Longrightarrow$ gp80/gp130 $\Longrightarrow$ STAT3
--

Experimente in KC-depletierten Tieren mittels Clodronat-Liposomen verdeutlichten die zentrale Rolle der KC für die Regulation des Regenerationsprozesses durch die Produktion wachstumsstimulierender Zytokine (Takeishi et al. 1999; Meijer et al. 2000;

**Abshagen et al. 2007**). Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das Fehlen der KC durch veränderte hepatische Zytokinexpressionsmuster negative Effekte auf den Verlauf der Leberregeneration ausübt (Meijer et al. 2000; **Abshagen et al. 2007**). So konnten wir in diesen Tieren keine resektions-bedingte Erhöhung der TNF- $\alpha$ -und IL-6 Konzentrationen sowie eine verminderte Aktivierung von NF- $\kappa$ B beobachten, was letztendlich in einer eingeschränkten Zellproliferation und signifikant verzögerten Restauration des Lebergewichtes resultierte (**Abshagen et al. 2007**). Die Ergebnisse der Studien zusammenfassend kann vermutet werden, dass der Effekt von TNF- $\alpha$  auf die hepatozelluläre Proliferation die Beteiligung der KC und speziell des KC-spezifischen NF- $\kappa$ B erfordert.

Besonders schwierig ist es, die genaue Funktion von IL-6 für die Leberregeneration zu bestimmen, da ca. 40% der 'immediate-early' Genen in Abhängigkeit von IL-6 exprimiert werden (Li et al. 2001). In den ersten Stunden nach PH werden stark erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen mit einem Maximum 24 Stunden nach PH beobachtet. Daraus resultieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und eine massiv gesteigerte Expression von Zielgenen (Cressman et al. 1995; Trautwein et al. 1996). Mehrere Studien konnten durch kurzzeitige zusätzliche Gabe oder Überexpression von IL-6 pro-mitogene und anti-apoptotische Effekte auf Hepatozyten *in vivo* nachweisen (Selzner et al. 1999; Jin et al. 2006). Eine weitere Aufklärung der Funktion dieses Zytokins erfolgte durch die Nutzung von IL-6 knockout Mäusen, welche nach PH eine gestörte hepatozelluläre Proliferation und Leberzellnekrosen zeigten, was mit einer erhöhten Mortalität einherging (Cressman et al. 1996). Diese Veränderungen waren mit der Abwesenheit von STAT3 und der Inhibition der AP-1 Bindungsaktivität assoziiert (Cressman et al. 1996). Der veränderte Phänotyp nach PH in IL-6 knockout Tieren konnte durch die Gabe von IL-6 vollkommen revertiert werden (Cressman et al. 1996). Außerdem berichteten Sakamoto et al. (1999) von einer erhöhten Apoptoserate und einem geringeren BrdU (Bromdesoxyuridin)-Einbau-Index in den IL-6 defizienten Mäusen. Dies resultierte zwar in einer verzögerten Proliferation der Hepatozyten, nicht aber in einem signifikanten Unterschied in der Wiederherstellung der Lebermasse (Sakamoto et al. 1999; Blindenbacher et al. 2003). Weitere Hinweise für eine Rolle von IL-6 bei der Hepatozytenproliferation konnten durch Experimente mit doppeltransgenen Tieren, die sowohl IL-6 als auch den Rezeptor gp80/gp130 unter der Kontrolle von leberspezifischen Promotoren exprimierten, gewonnen werden. Diese Mäuse entwickelten hyperplastische Knoten, welche humanen regenerativen hyperplastischen Knoten ähnelten (Maione et al. 1998; Schirmacher et al. 1998). Die essentielle Rolle von IL-6 für die Leberregeneration wurde auch durch Untersuchungen an TNFR1 knockout Mäusen festgestellt (Yamada et al. 1997). In diesen

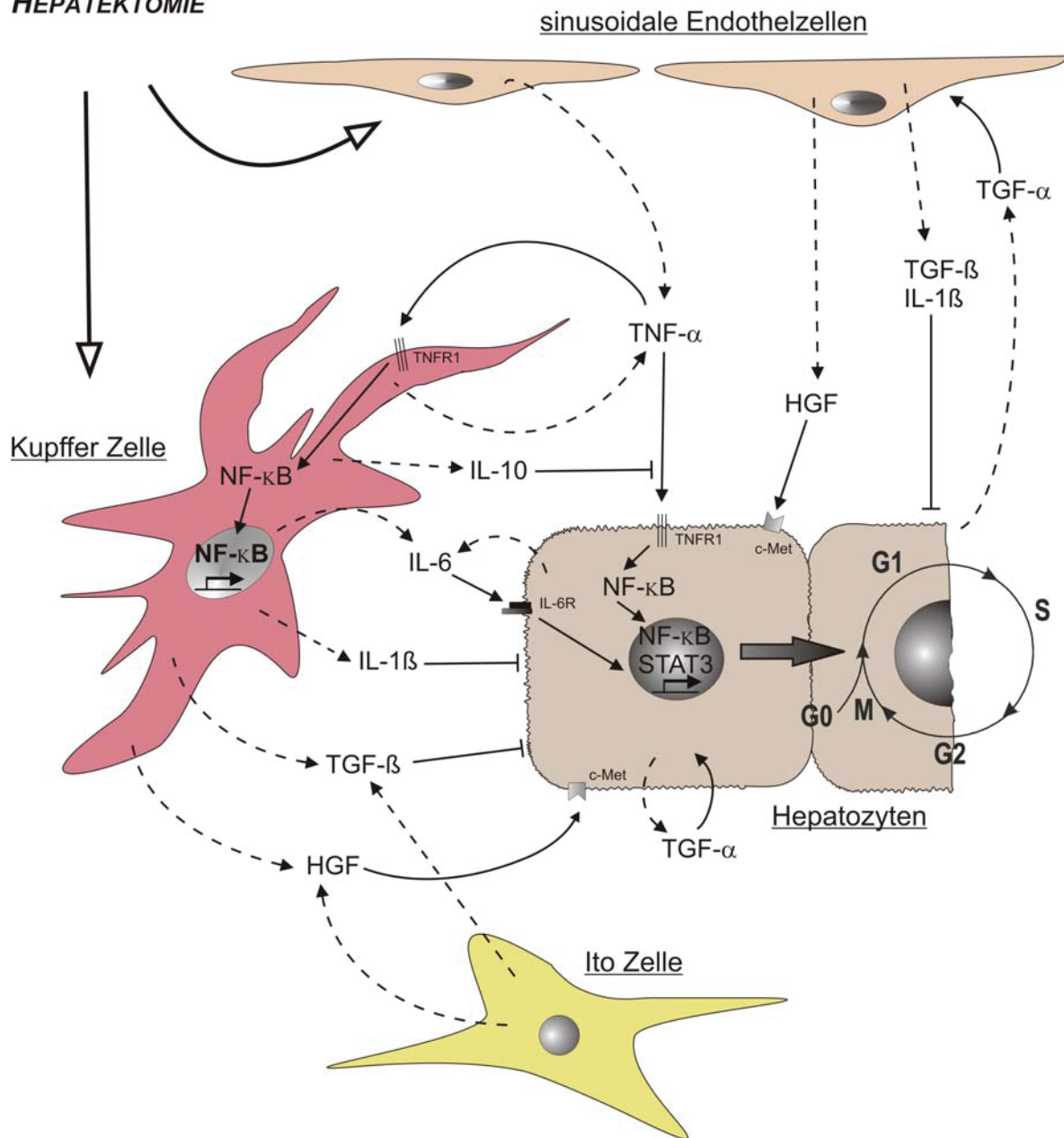
Mäusen war die NF- $\kappa$ B Aktivierung nach PH stark verzögert und keine erhöhten IL-6 Serumkonzentrationen nachweisbar. Als Ergebnis zeigen die TNFR1 knockout Mäuse eine ähnlich veränderte Legerregeneration wie IL-6 knockout Tiere. Analog zu IL-6 defizienten Mäusen konnte in den TNFR1 knockout Tieren der Phänotyp durch IL-6 Injektion aufgehoben werden (Yamada et al. 1997). Diese Experimente bestätigten die Hypothese, dass TNF- $\alpha$  abhängige Effekte für die Aktivierung der IL-6 Expression verantwortlich sind und wahrscheinlich in den Kupffer- oder anderen Nichtparenchymzellen stattfinden. Diese Hypothese wird weiterhin durch unsere Beobachtungen in KC-depletierten Mäusen gestützt, welche neben verminderten TNF- $\alpha$  Konzentrationen auch reduzierte IL-6 Konzentrationen aufweisen (**Abshagen et al. 2007**). Aufgrund dieser Ergebnisse kann folgendes Modell entwickelt werden, welches die Rolle von TNF- $\alpha$  und IL-6 während der Leberregeneration, wie folgt, skizziert: Eine PH führt primär zur erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$ . Die Bindung von TNF- $\alpha$  an TNFR1 auf KC führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den KC und zur Sekretion von IL-6 (**Abshagen et al. 2007**). Die IL-6-abhängigen Signalwege im Hepatozyten sind schließlich für die Zellzyklusprogression entscheidend.

Diese Zytokin-vermittelten Signale (Abb. 5), aber auch die Akkumulation freier Sauerstoffradikale setzen sofort eine Kaskade intrazellulärer molekularer Ereignisse in Gang. So werden STAT3 und der Translations-unabhängige Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B innerhalb von nur 30 Minuten nach PH aktiviert (Cressman et al. 1995; FitzGerald et al. 1995; Michalopoulos & DeFrances 1997). Die schnelle Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfordert posttranslationale Mechanismen, welche die Phosphorylierung und Degradierung seines Inhibitors I- $\kappa$ B (Inhibitory-kappaB) beinhalten. Frei vom Inhibitor wird der heterodimere NF- $\kappa$ B Komplex, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, in den Zellkern transportiert, wo dieser Zielgene, welche in Ereignisse, wie Inflammation, Zelladhäsion, Stress, Zellproliferation und Apoptose involviert sind, aktiviert. Tierexperimentelle Studien konnten die fundamentale Rolle des NF- $\kappa$ B-Signalweges für die Regulation der Apoptose und Proliferation von Hepatozyten während der Leberregeneration aufzeigen (Plümpe et al. 2000). So führte die Inaktivierung von NF- $\kappa$ B durch adenovirale Überexpression einer I- $\kappa$ B Mutante zu massiver Leberzellapoptose und gestörter Zellproliferation, assoziiert mit verminderter Produktion von ‚downstream‘ Zytokinen (Iimuro et al. 1998, Yang et al. 2005). Obwohl klare Hinweise für pro-proliferative Eigenschaften von NF- $\kappa$ B vorliegen, ist es überraschend, dass in einem transgenen Mausmodell die selektive Blockade von NF- $\kappa$ B in Hepatozyten keinen Einfluss auf deren Proliferation und Apoptose nach PH zeigte (Chaisson et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass besonders Nichtparenchymzellen für die Vermittlung der proliferativen und anti-apoptotischen Effekte von



NF- $\kappa$ B während des Regenerationsprozesses verantwortlich sind. Die Theorie der variierenden Funktion von NF- $\kappa$ B in den verschiedenen Leberzelltypen konnte durch die Verwendung spezieller knockout Technologien bestätigt werden (Maeda et al. 2005). Die Autoren Maeda et al. beobachteten nur dann eine stark eingeschränkte Leberregeneration, wenn neben dem Hepatozyten- auch KC-spezifisches NF- $\kappa$ B inhibiert wurde. Interessanterweise konnten Yang et al. (2005) unter Verwendung eines transgenen *cis*-NF- $\kappa$ B-EGFP Mausmodells die NF- $\kappa$ B-Aktivierung während der Leberregeneration ausschließlich in KC lokalisieren. Damit einhergehend beobachteten wir in KC-depletierten Mäusen keine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivität nach PH, was sich wiederum negativ auf NF- $\kappa$ B-abhängige ‚downstream‘ Ereignisse, wie Zytokinproduktion und Zellproliferation auswirkte und von einer verzögerten Leberregeneration begleitet war (**Abshagen et al. 2007**). Unsere Daten stärken die Hypothese, dass die KC-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivität für eine normale Regeneration nach PH von entscheidender Bedeutung ist (**Abshagen et al. 2007**).

Ebenfalls konnte in Tierexperimenten, in denen die Leberregeneration nach 2/3 Hepatektomie untersucht wurde, eine Vielzahl an wachstumsregulierenden Faktoren identifiziert werden (Michalopoulos 1994) (Abb. 5). Hierbei unterscheidet man zwischen kompletten Mitogenen und Co-Mitogenen. Komplette Mitogene (u.a. HGF, TGF- $\alpha$ , EGF, Amphiregulin) bewirken auch *in vitro* eine direkte Stimulation der DNA-Synthese, wohingegen Co-Mitogene (u.a. Glukagon, Insulin, Norepinephrin, Adrenalin, Trijodthyronin, Vitamin D) in der Lage sind, die Wirkung von Wachstumsinhibitoren zu verringern oder die mitogen-induzierte DNA-Replikation lediglich zu verstärken. Sie sind jedoch nicht imstande, in Abwesenheit der kompletten Mitogene eine DNA-Synthese zu induzieren (Court et al. 2002). Während die Zelle durch die Wachstumsfaktoren stimuliert wird, befindet sich die Leberzellregeneration in der zweiten kritischen Phase. Die proliferierenden Hepatozyten sind zunächst auf die Anwesenheit der Wachstumsfaktoren angewiesen, um den Zellzyklus zu durchlaufen. Im Zuge der ‚delayed early gene‘ Antwort kommt es zur Expression weiterer Zellzyklusgene. Hierzu gehören das anti-apoptotisch wirkende Bcl-x<sub>L</sub> (Fausto 2000, 2001) sowie einige Zellzyklusinhibitoren (p53, p21, p102). Entscheidend für die Unabhängigkeit der Zelle von Wachstumsfaktoren ist aber die Expression von Zellzyklus-Stimulatoren, wie Cyclin D1 und Cyclin E. Den Zeitpunkt, an dem die Zelle nicht mehr auf die Stimulation durch Wachstumsfaktoren angewiesen ist, bezeichnet man als ‚G1 restriction point‘. Die Zelle ist nun in der Lage, den Zellzyklus autonom mit Eintritt in die Mitose zu beenden (Pestell et al. 1999; Sherr & Roberts 1999; Taub 2004).

**PARTIELLE  
HEPATEKTOMIE**

**Abb.5.** Vereinfachte schematische Darstellung wichtiger Zytokin- und Wachstumsfaktor-gesteuerter Signalwege in den verschiedenen Leberzelltypen nach PH.

HGF ist ein potentes Mitogen, welches die hepatozelluläre DNA-Synthese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induziert und somit das Wachstum und die Funktion der regenerierenden Leber stimuliert (Nakamura 1994; Shiota et al. 1994). HGF wird von Nichtparenchymzellen der Leber gebildet (Maher 1993), was neben der systemischen Wirkung von HGF auch einen parakrinen Mechanismus nahe legt (Pediaditakis et al. 2001). Es ist jedoch unklar, ob die Lokalisation der enzymatischen Aktivierungssysteme oder die Verteilung



der HGF-Rezeptoren für die gewebespezifische Wirkung verantwortlich ist (Mars et al. 1993). HGF ist in diverse Prozesse unterschiedlichster Zelltypen, v.a. aber in die Gewebeentwicklung, involviert. Der hochaffine Rezeptor für HGF, c-met (Mesenchymal epithelial transition factor), wird auf Hepatozyten exprimiert, wobei die Hepatozyten erst nach der Leberschädigung als eine Art ‚Priming‘ durch TNF- $\alpha$  und IL-6 gegenüber HGF sensitiv werden. Die proliferative Antwort der Hepatozyten auf HGF steigt dann bis zu 60% an (Webber et al. 1994a; Fausto et al. 1995). Die HGF Konzentrationen im Serum steigen bereits 1 Stunde nach Hepatektomie an und bleiben für ca. 72 Stunden erhöht. Obgleich auch extrahepatisches HGF eine hepatozelluläre Proliferation induzieren könnte, ist intrahepatisches HGF nichtparenchymaler Zellen von primärer Bedeutung für die Leberregeneration. So beobachteten Takeishi et al. (1999) in KC-depletierten Mäusen eine verminderte HGF Produktion, welche vermutlich zur Verzögerung der Leberregeneration beiträgt. Der stark protektive und mitogene Effekt von HGF/c-met auf die Leber wird aktuell als ein möglicher therapeutischer Ansatz in verschiedenen Leberschädigungsmodellen erforscht (Ido et al. 2004).

TGF- $\alpha$ , produziert von Hepatozyten, HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) und Amphiregulin sind Mitglieder der EGF-Familie, deren Bindung an Rezeptoren (EGFR) eine Phosphorylierungskaskade aktiviert, welche zur DNA-Replikation führt. EGF ist ein endokriner Faktor, welcher von den Speicheldrüsen und Brunner Drüsen des Dünndarms produziert wird und dessen Plasma-Konzentrationen nach PH bis zu 30% ansteigen (Michalopoulos & DeFrances 1997). Das über autokrine Mechanismen wirkende TGF- $\alpha$  verstärkt bei transgener Expression zwar die hepatozelluläre Proliferation (Webber et al. 1994b), jedoch zeigen knockout Tiere keine veränderte Leberregeneration. Dies weist auf kompensatorische Mechanismen durch andere EGFR Liganden hin (Russell et al. 1996). Die Expression von HB-EGF nach PH ist der Expression von EGF und TGF- $\alpha$  vorangestellt, was vermuten lässt, dass HB-EGF den Übergang von der ‚Priming‘- zur Progressions-Phase steuert (Mitchell et al. 2005). Im Gegensatz zu TGF- $\alpha$  führt eine Defizienz von HB-EGF zu einer verzögerten DNA-Synthese nach PH (Mitchell et al. 2005). Daraus wird ersichtlich, dass diese EGFR-Liganden bedeutend für die Hepatozytenreplikation sind und alle zusammen, obwohl teilweise überlappend fungierend, für eine optimale Regeneration benötigt werden (Michalopoulos & Khan 2005). Diese Wachstumsfaktoren, einzeln oder in Kombination miteinander, könnten somit bei diversen Lebererkrankungen wichtige Stimuli für das Überleben, Wachstum und Proliferation der Hepatozyten darstellen.

Als Gegenspieler zu den Wachstumsfaktoren fungieren sogenannte Inhibitoren, zu denen Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  und Activin A zählen (Michalopoulos 1994; Boulton et al.

1997). Sie besitzen die Möglichkeit, die mitogen-induzierte DNA-Synthese *in vitro* zu inhibieren. Hinsichtlich der Regulation der Proliferationshemmung konzentriert sich die überwiegende Zahl der Studien auf TGF- $\beta$ . *In vivo*-Versuche zeigten, dass eine andauernde exogene Zufuhr oder Überexpression von TGF- $\beta$  zu einer reduzierten Lebermasse führt (Russell et al. 1988; Sanderson et al. 1995) bzw. die Inaktivierung von TGF- $\beta$  eine stärkere proliferative Antwort nach PH induziert (Romero-Gallo et al. 2005). Diesbezüglich ist bekannt, dass TGF- $\beta$  über die Induktion anderer Faktoren die Aktivierung des Zytokins HGF verhindert (Carr et al. 1986). Jedoch ist aufgrund der Komplexität regenerativer Regulationsmechanismen anzunehmen, dass TGF- $\beta$  nicht als alleiniger Faktor ausreichend ist, regenerative Prozesse zu beenden.

Außer TGF- $\alpha$ , welcher von Hepatozyten produziert wird, werden alle anderen Wachstumsfaktoren von Nichtparenchymzellen freigesetzt. Diese parakrine Wirkungsweise verdeutlicht, dass die Interaktionen zwischen Parenchym- und Nichtparenchymzellen für den regenerativen Prozess essentiell sind und in bestimmtem Umfang *in vivo* durch die Blockade der Nichtparenchymzellen inhibiert werden können (Meijer et al. 2000; **Abshagen et al. 2007**).

Für die Kopplung der Signalwege von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind u.a. extrazelluläre Proteasen wie MMP's und ADAM's (A Disintegrin And Metalloprotease) wichtig. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Proteasen Zytokine und Wachstumsfaktoren hinsichtlich ihrer Bioaktivität positiv beeinflussen (Mohammed & Khoka 2005). So kann TNF- $\alpha$  über die Aktivierung von MMP's und ADAM's mit anschließender Degradierung von EZM-Komponenten (Sérandour et al. 2005) und Freisetzung von HGF und TGF- $\alpha$  (Argast et al. 2004) die hepatozelluläre Proliferation induzieren.

Zahlreiche Studien untersuchen pro-regenerative Effekte diverser Substanzen auf den Regenerationsprozess. Durch Leberteilresektion werden u.a. auch extrahepatische Signale hochreguliert, die über den portalen Blutzufluss die Leber erreichen und hepatische Nichtparenchymzellen aktivieren, die Produktion von Zytokinen zu steigern. Als ein weiteres Co-Mitogen, welches die Funktion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. EGF und TGF- $\alpha$  verstärkt, ist Insulin zu nennen. In einem Modell zur Leberatrophie konnte durch zusätzliche Gabe von Insulin die Hepatozytenproliferation induziert und somit eine Atrophie verhindert oder reduziert werden (Starzl et al. 1976). Insulin gilt daher als ein wichtiger Regulator der Hepatozyten-Funktion und der Aufrechterhaltung der Homöostase während der Leberregeneration (Michalopoulos 2007). Auch für andere Hormone, wie Glukagon, Thyroidhormon, Parathormon, Prolaktin und Östrogen, welche infolge des metabolischen und chirurgischen Stresses nach PH freigesetzt werden, wurden co-mitogene Eigenschaften beobachtet (Diehl & Rai 1996).

Darüber hinaus konnten Selzner et al. (2003) in ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)-defizienten Mäusen die zentrale Rolle dieses Adhäsionsmoleküls für die Leberregeneration untersuchen. Aufgrund der eingeschränkten hepatozellulären Regeneration und verminderter TNF- $\alpha$  und IL-6-Konzentrationen in diesen Mäusen wird vermutet, dass ICAM-1 über die Aktivierung von Leukozyten die Freisetzung von Zytokinen aus KC vermittelt und dadurch die hepatozelluläre Proliferation triggert.

Des Weiteren wurde in einer aktuellen Studie auch die Beteiligung der Thrombozyten am Prozess der Leberregeneration gezeigt. Diese Funktion scheint vorwiegend durch den Neurotransmitter Serotonin vermittelt zu sein, welcher im Blut durch Thrombozyten transportiert wird. So konnte bei Mäusen, welchen das Thrombozyten-abhängige Serotonin als Co-Mitogen fehlte, eine verminderte Hepatozytenproliferation beobachtet werden (Lesurtel et al. 2006).

Fernandez et al. (2006) verdeutlichten kürzlich die Bedeutung der Caveolae für die Leberregeneration. Caveolae sind Domänen in der Plasmamembran der meisten Zellen, welche für die intrazelluläre Signaltransduktion und Membranstrukturierung bedeutend sind. Das Phänomen der transienten Lipideinlagerungen in den Hepatozyten ist eine essentielle Komponente des regenerativen Prozesses, welcher maßgeblich von Caveolin-1 (Cav-1) abhängig ist. So zeigten Mäuse, denen das Caveolae-Strukturprotein Cav-1 fehlte, eine signifikant eingeschränkte Leberregeneration nach PH (Fernandez et al. 2006).

## 4 Mikrozirkulation bei Leberregeneration

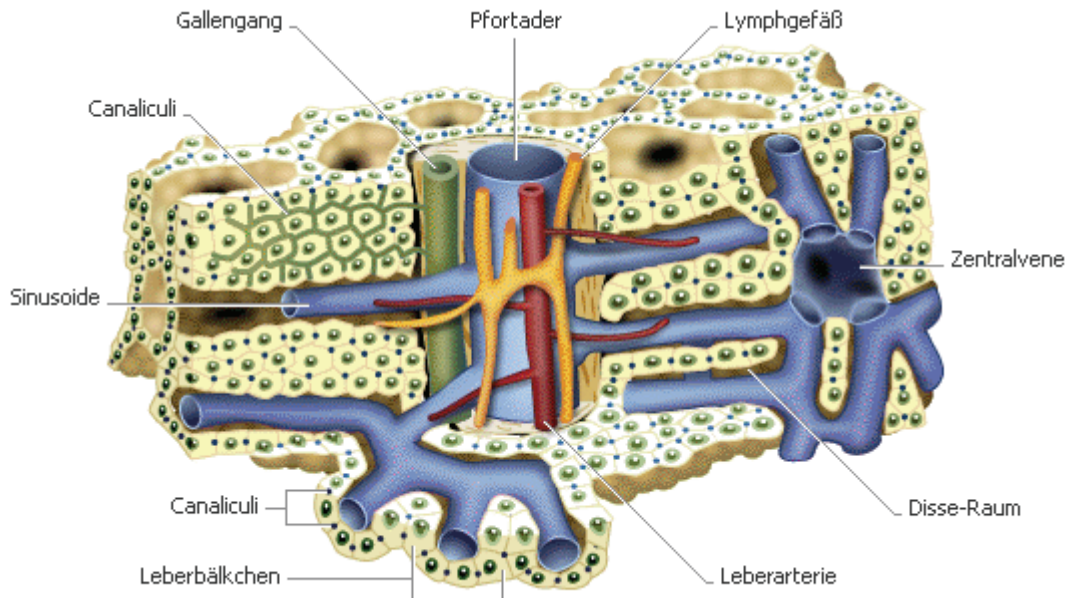
### 4.1 Hepatische Makro- und Mikrozirkulation nach partieller Hepatektomie

Für das Verständnis von Mikrozirkulationsstörungen an der Leber ist die Kenntnis der besonderen mikrovaskulären Anatomie der Leber von Bedeutung. Die Besonderheit der hepatischen Mikrozirkulation resultiert zum einen aus der dualen, d.h. portal-venösen und arteriellen Gefäßversorgung, zum anderen aus der spezialisierten kapillaren Morphologie mit Sinusoiden, fenestriertem Endothel und dichtem Besatz von KC (Oda et al. 2006).

Die Leber erhält einerseits nährstoffreiches Blut über die Pfortader (V. portae) aus den unpaaren Bauchorganen und andererseits sauerstoffreiches Blut über die Leberarterie (A. hepatica), welche als eine der Endäste der A. coeliaca arterielles Blut dem Organ zuführt. Zusammen mit dem austretenden Ductus choledochus (Lebergallengang) können diese Gefäße an der Leberpforte lokalisiert werden (Abb. 6). Diese Dreierheit aus Ästen der Pfortader, der Leberarterie und des Gallenganges bestimmt auch den mikroskopischen Aufbau der Leber und findet sich als Glisson'sche Trias des Leberläppchens wieder. Die Leber wird mit rund 30% des Herzzeitvolumens durchblutet. Unter Ruhebedingungen wird die Sauerstoffversorgung der Leber zu gleichen Teilen von der A. hepatica und V. portae getragen, wobei die A. hepatica mit nur ~30% an der Lebergesamtdurchblutung beteiligt ist (Schiff & Schiff 1993). In den Sinusoiden mischt sich venöses Pfortaderblut mit arteriellem Blut der Leberarterie, wobei auch vereinzelt ausschließlich arteriell- bzw. portal-venös-perfundierte Sinusoide vorkommen (Sasse et al. 1992). Der Abfluß des Leberblutes erfolgt dabei über die Zentralvenen in die Lebervenen (Vv. hepaticae) und von dort direkt in die untere Hohlvene (V. cava inferior).

Die Anatomie der Mikrozirkulation ist durch ein Netzwerk der Endstrombahn charakterisiert, welches aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit einem Einzeldurchmesser von weniger als 30-50 µm besteht (Oda et al. 2003). Die wichtigere Definition der hepatischen Mikrozirkulation bezieht sich allerdings auf den funktionellen Aspekt, dass nämlich die kapillare Endstrombahn, d.h. der Sinusoid, den intensiven Stoff- und Gasaustausch überhaupt ermöglicht. Somit ist eine intakte Mikrozirkulation essentiell für die nutritive Perfusion des Gewebes und damit entscheidend für eine adäquate Organfunktion. Weiterhin spielen die mikrovaskuläre Rheologie und Blutfluidität eine wesentliche Rolle in der suffizienten Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff. Letztere ist von den Fließbedingungen und den Fließeigenschaften des Blutes abhängig. Determinanten der Fließbedingungen sind der Perfusionsdruck und die Gefäßgeometrie. Die

Fließeigenschaften werden wiederum durch den Hämatokrit, der Viskosität, der Erythrozytenverformbarkeit und der Leukozytenrheologie bestimmt.



**Abb.6.** Gefäßversorgung der Leber.

([http://de.encarta.msn.com/media\\_1041500574/Anatomischer\\_Aufbau\\_der\\_Leber.html](http://de.encarta.msn.com/media_1041500574/Anatomischer_Aufbau_der_Leber.html); 20. Feb. 2008)

Auffallend am spezialisierten mikrovaskulären System der Leber ist ein hoher Druckgradient zwischen präsinusoidalen portalen Venolen und Arteriolen einerseits und Sinusoiden andererseits (Nakata et al. 1960). Die anatomisch-physiologische Erklärung für die Anpassungsfähigkeit an fluktuierende Blutmengen aus dem zuführenden Gefäßbett des Splanchnikusgebietes liefert die hohe Elastizität der Mikroangioarchitektur der Leber (Ekataksin & Kaneda 1999). Variablen sind sowohl die Aufhebung des physiologischen Durchmessergefälles von perizentral nach periportal als auch die Inanspruchnahme einer „Expansionsreserve“ durch Streckung der besonders im Periportalbereich torquierten Sinusoide (Ekataksin & Kaneda 1999). Die intrahepatische Mikrozirkulation wird entlang der mikrovaskulären Segmente durch unterschiedliche Zellen reguliert (McCuskey 2000). Für die Kontrolle des prä- und postsinusoidalen Gefäßwiderstandes sind vermutlich die glatten Gefäßmuskelzellen in Pfortadervenen und Lebervenen verantwortlich. Im Kapillarbett der Sinusoide spielen hingegen die kontraktile EC (Oda et al. 2003), die KC (**Abshagen et al. 2008**) und v.a. die Ito-Zellen für die Regulation des Gefäßwiderstands eine wichtige Rolle. Diese Zellen liegen in den Sinusoiden eng beieinander und beeinflussen sich gegenseitig (Abb. 7). Unter dem

Einfluss vasoaktiver Substanzen sind die Ito-Zellen in der Lage, sich durch ihre langen Zytoplasmafortsätze, mit denen sie die Sinusoide umschlingen, zu kontrahieren bzw. zu relaxieren. Dies ist Voraussetzung für die Regulation sowohl der sinusoidalen Durchmesser als auch der Anzahl und Durchmesser der Fenestrae, wodurch eine Steuerung des Plasmaflusses in den Disse'schen Raum ermöglicht wird (Oda et al. 2003). Somit spielen die Ito-Zellen durch ihre direkte Beeinflussung des sinusoidalen Durchmessers eine zentrale Rolle in der Regulation des intrahepatischen Blutflusses. Im Gegensatz dazu wurde den KC bei der Regulation der hepatischen Mikrozirkulation während der Leberregeneration bislang nur wenig Bedeutung beigemessen, obgleich deren Beteiligung an der Modulation des hepatischen Blutflusses durch die Expression vasoaktiver Enzymsysteme bereits mehrfach beschrieben ist (Kawada et al. 1993; Takei et al. 1993; Kim & Lee 2004; **Abshagen et al. 2008**).

Unter physiologischen Bedingungen wird die hepatische Mikrozirkulation durch die fein regulierte Balance zwischen Vasokonstriktoren, wie Endothelin-1 (ET-1) und Vasodilatoren, wie NO und CO, aufrechterhalten. Diese werden von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der Hämoxxygenase-1 (HO-1) produziert (Pannen et al. 1996). Als weitere vasoaktive Substanzen der Leber fungieren u.a. Prostaglandine und Katecholamine (Oda et al. 2003; Palmes et al. 2005). Unter Stressbedingungen, wie z.B. Ischämie/Reperfusion (Sonin et al. 1999), Endotoxinämie (Pannen et al. 1996) oder bei small-for-size Transplantation (Palmes et al. 2005), ist diese Balance zugunsten der Vasokonstriktion gestört.

Nach 70%-iger PH wird das nun auf 1/3 reduzierte Kapillarbett der Leber vom initialen Blutvolumen perfundiert. Blutflussmessungen zeigen nach PH eine deutliche portale Einflusstauung mit Zunahme des Pfortaderdrucks in den verbleibenden Leberlappen (Lee et al. 1987; Yamamoto et al. 1992) und konsekutiver Verminderung des absoluten Pfortaderflusses (Ekataksin & Kaneda 1999). Gleichermäßen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die portale Einflusstauung sich retrograd aus dem reduzierten sinusoidalen Kapillarnetz fortleitet (Lee et al. 1987). So konnten Lee et al. im Modell der isoliert perfundierten Leber von 30% und 70% hepatektomierten Lebern eine lineare Blutflussvolumen-/Pfortaderdruck-Kurve erstellen, wobei die Anstiegssteilheit der Regression den reduzierten sinusoidalen Gesamtquerschnitt widerspiegelte. Analog zum Pfortaderfluss - jedoch in stärkerem Ausmaß - verringert sich während der Resektion der Blutfluss der A. hepatica (Lee et al. 1987; Cantré et al. 2008). In der Summe resultiert jedoch eine erhöhte Ratio von Blutfluss zu Lebermasse, was sich in einem ca. 2,5-fach erhöhten portalen Blutfluss pro Lebergewebseinheit widerspiegelt. Die daraus resultierende sinusoidale Hyperperfusion hält über mehrere Tage nach PH an (Braet et al. 2004).



Somit wirken vermehrt Druck und Scherkräfte auf das relativ stärker perfundierte Restleberareal, was als möglicher Stimulus für die Initialisierung des Regenerationsprozesses diskutiert wird. Im Gegensatz zum portal-venösen Blutfluss kommt es - bezogen auf das Leberrestvolumen - zur arteriellen Hypoperfusion des restlichen Lebergewebes. Dies induziert durch einen verminderten intrahepatischen Sauerstoffpartialdruck eine hypoxische Antwort, welche wiederum als Auslöser der regenerativen Antwort in Betracht gezogen wird (Michalopoulos 2007). Die Auswirkungen dieser hämodynamischen Änderungen auf das restliche Lebergewebe sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden.

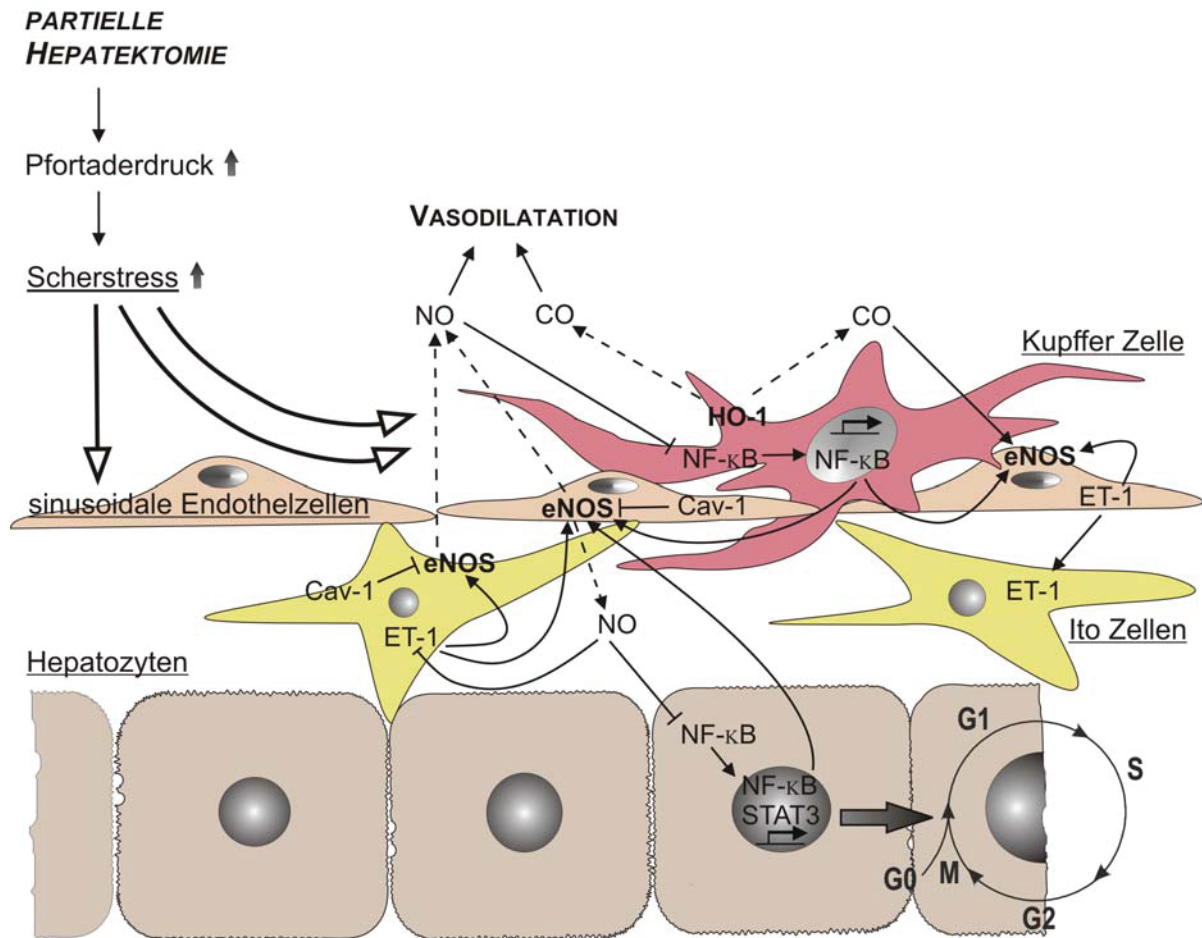
Neben der Makrozirkulation gilt es, mikrozirkulatorische Einflüsse zu berücksichtigen. So steigt das Interesse am Monitoring der Mikrozirkulation in tierexperimentellen (Vollmar et al. 1996) und klinischen Studien (Spronk et al. 2004) beständig. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Störungen der Mikrozirkulation als wesentliche pathophysiologische Komponente und Determinante von Erkrankungen zunehmend erkannt werden. In einer Reihe tierexperimenteller Untersuchungen wurde die Mikrozirkulation der Leber u.a. mit der Laser-Dopplerfluss-Technik und der IVM nach PH untersucht und mikrovaskuläre Blutflussveränderungen im Bereich der Leber analysiert. So konnten wir erhöhte Druck- und Scherkräfte nach 70% Hepatektomie beobachten, welche charakteristische Veränderungen des Lebergewebes hervorrufen (**Abshagen et al. 2006, 2008**). In morphologischen Studien zeigten andere Arbeitsgruppen und wir die erheblichen Auswirkungen einer portalen Mehrdurchblutung nach PH auf die Lebergewebsarchitektur, wie Dilation der sinusoidalen Strombahn und des Disse'schen Raums sowie ödematös geschwollene Hepatozyten mit Auflockerung der Parenchymzellverbände (Um et al. 1994; **Abshagen et al. 2006, 2008**). Diese Beobachtungen führen zu folgender Hypothese der Regulation der sinusoidalen Durchblutung: Bei Resektionen bis 70% wird die sinusoidale Durchblutung trotz portaler Druckerhöhung in der verhältnismäßig hyperperfundierten Leber weitgehend konstant gehalten, erkennbar an dem nur geringfügigen, allerdings signifikanten Anstieg des sinusoidalen Durchmessers (**Abshagen et al. 2006**). Bei erweiterten Resektionen, d.h. bei einer massiven Reduktion der Endstrombahn mit drastischer Hyperperfusion der Restleber, kommt es zur Dekompensation mit erheblicher Weitstellung der Sinusoide und Schädigung der Restleber (Panis et al. 1997).

Die funktionelle Kapillardichte ist ein allgemein anerkannter mikrozirkulatorischer Parameter, mit dessen Hilfe man die Qualität der kapillaren Gewebepfusion und damit die kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Substraten sowie den Abtransport von Stoffwechselmetaboliten beurteilen kann (Nolte et al. 1995). Nach Leberteilresektion konnten wir zunächst eine geringere morphologische Kapillardichte beobachten

(**Abshagen et al. 2006**). Dies ist zum einen durch erweiterte Sinusoide bedingt, wodurch es zur sinusoidalen Raumforderung kommt. Zum anderen wird aufgrund des Ödems innerhalb des Leberläppchens mit gleichzeitiger hepatischer Schwellung ein effektiv kleinerer Bildausschnitt und damit eine relativ geringere Anzahl an Sinusoiden durch die Analyse erfasst.

Wie bereits angedeutet, beruht dieses Phänomen der Sinusoidaldurchblutung auf muskuläre bzw. zelluläre Regulationsmechanismen. Aufgrund der Tatsache, dass die KC durch ihre Lage in den Sinusoiden wahrscheinlich die ersten Zellen sind, welche lokale hämodynamische Veränderungen nach PH wahrnehmen, kann vermutet werden, dass die KC durch Regulation der hepatischen Mikrozirkulation die Leberregeneration beeinflussen (**Abshagen et al. 2008**). In einer neuesten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte die Bedeutung der KC für eine adäquate Leberregeneration erweitert werden, indem erstmals deren Einfluss auf den mikrovaskulären Tonus und Scherstress als initialen Trigger der Leberregeneration gezeigt wurde (**Abshagen et al. 2008**). Entsprechend anderer Studien wird den KC dabei eine wesentliche Rolle in der Expression und parakrinen Regulation der HO-1 zugeschrieben (Kim & Lee 2004; **Abshagen et al. 2008**) (Abb. 7). Die Induktion der HO-1, auch als Hitzeschockprotein 32 bekannt, schützt die Zellen vor oxidativem Stress, indem freigesetztes CO über die Aktivierung der Guanylatzyklase vasodilativ wirkt und so die Perfusion verbessert (Suematsu et al. 1994; Bauer & Bauer 2002). Untersuchungen verschiedener Leberschädigungsmodelle zeigten, dass die Blockade der KC zur Aufhebung der HO-1 Induktion führte (Paxian et al. 2001; Kim & Lee 2004), was auf eine KC-spezifische Expression der HO-1 schließen lässt (Goda et al. 1998; Immenschuh et al. 2003). Des Weiteren verdeutlichten unsere Experimente in KC-depletierten Tieren, dass die HO-1 auch während der Leberregeneration maßgeblich von KC exprimiert wird und das freigesetzte CO vermutlich an der Resektions-induzierten sinusoidalen Vasodilatation beteiligt ist (**Abshagen et al. 2008**). Damit einhergehend konnte eine Überexpression der HO-1 in post-ischämischen Lebern die Leberregeneration nach PH verbessern (Glanemann et al. 2005b). Diese Ergebnisse stützen unsere Hypothese, dass die KC-spezifische HO-1-Induktion nach PH essentiell für die Aufrechterhaltung der hepatischen Mikrozirkulation während der Leberregeneration ist, da das Fehlen der KC eine Verminderung der sinusoidalen Vasodilatation und intrahepatischen Hyperperfusion zur Folge hat (**Abshagen et al. 2008**). Andererseits gibt es Argumente, dass v.a. endogenes CO vasodilative Effekte auf die Portalvene und Sinusoide ausübt, während NO eher als potenter Vasodilator der Leberarterie fungiert (Pannen & Bauer 1998).





**Abb.7.** Regulation der hepatischen Mikrozirkulation nach PH.

## 4.2 Scherstress als Trigger der Leberregeneration

Neben metabolischen Faktoren und einem unspezifischen chirurgischen Trauma werden mechanische Kräfte, welche nach PH durch Veränderungen des Pfortaderflusses entstehen, als mögliche physiologische Auslösemechanismen für die Leberregeneration auf mikrozirkulatorischer Ebene diskutiert (Sato et al. 1999; Niiya et al. 1999).

Die Theorie, dass die Restleber nach PH hämodynamischem Stress unterliegt, der durch die portale Mehrdurchblutung hervorgerufen wird, wird durch jüngste Untersuchungsergebnisse gestützt (Um et al. 1994; Morsiani et al. 1995; Rocheleau et al. 1999; Schoen et al. 2001). So konnte gezeigt werden, dass es nach Volumenverkleinerung oder auch nach Pfortaderligatur zu einer portalen Hyperperfusion der residuellen Leber bzw. des nicht okkludierten Leberareals kommt (Kahn et al. 1984; Niiya et al. 1999; Eguchi et al. 2003). Hierbei ist denkbar, dass durch die Erhöhung des Pfortaderdruckes bedingte Druck- und Scherkräfte, die das vorbeiströmende Blut auf das Endothel ausübt, bestimmte Signalkaskaden in den Leberzellen freisetzen und somit einen Trigger zur

Leberregeneration setzen (Schoen et al. 2001; Kawai et al. 2002). Anhand eines Vergleichsmodells zwischen PH und Pfortaderligatur der Ratte konnte gezeigt werden, dass die portale Hyperperfusion selektiv zur Induktion der ‚immediate-early‘ Gene im portal hyperperfundierten Areal führt, welche wiederum als ‚Priming‘ Mechanismen in der späteren Leberregeneration angesehen werden können (Mueller et al. 2002). Darüber hinaus lassen ultrastrukturelle Untersuchungen vermuten, dass die hämodynamischen Veränderungen nach PH die Leberregeneration beeinflussen, da primär die Permeabilität der sinusoidalen EC für hepatotrophe Substanzen erhöht wird (Morsiani et al. 1995).

Es wird vermutet, dass der sinusoidale Scherstress nach PH sowohl die Hepatozyten- als auch EC-Regeneration triggert und so die Lebergröße regulieren kann (Sato et al. 1997). Der erhöhte Scherstress führt unmittelbar zur Aktivierung von EC und KC und Freisetzung pro-proliferativer Mediatoren (Fausto 2001; Black et al. 2004a) sowie zur erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und nachfolgender Leukozytenaktivierung (Selzner et al. 2003). Des Weiteren ist die frühzeitige Aktivierung von uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator) zu beobachten, was u.a. den Abbau der EZM und somit die Freisetzung gebundener Wachstumsfaktoren, insbesondere HGF, bewirkt. Es wurde mehrfach berichtet, dass erhöhter Scherstress die Expression zahlreicher Gene, wie c-fos, c-myc, TGF- $\beta$ , HB-EGF und eNOS innerhalb weniger Minuten nach PH induziert (Niiya et al. 1999) und so über differenzielle Signalwege die Leberregeneration initiiert. Weil besonders KC und EC nach PH übermäßigen hämodynamischen Kräften ausgesetzt sind, scheinen diese den hepatischen Blutfluss über parakrine Mechanismen zu regulieren, indem sie die Produktion vasoaktiver Substanzen anderer Leberzellpopulationen induzieren (Abb. 7). So können KC, vermutlich über TGF- $\beta$ , die Produktion von NO und ET-1 in sinusoidalen EC stimulieren (Eakes & Olson 1998). Eine der wichtigsten vaskulären Adaptionen an hämodynamischen Stress ist die verstärkte Expression der eNOS bereits wenige Stunden nach PH (Uematsu et al. 1995; Hortalano et al. 1995; Grumbach et al. 2005). Die Bedeutung der eNOS für die Leberregeneration demonstrierten Rai et al. (1998) mittels eNOS knockout Mäusen. Aufgrund eingeschränkter Regeneration und erhöhter hepatozellulärer Apoptose in diesen Tieren kann vermutet werden, dass NO für das Überleben der Hepatozyten in Anwesenheit hoher Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 erforderlich ist. Neueste experimentelle Daten unterstützen die Hypothese, dass nach PH Scherstress-induziertes NO zur Expression von Genen, wie c-fos, führt, welche den Prozess der Leberregeneration triggern (Schoen & Lauth 2002). So zeigten Schoen & Lauth (2006), dass NO-Donoren in der Lage sind, die Expression früher Gene zu stimulieren und die Restauration des Lebergewichtes zu potenzieren, während die Blockade der eNOS die Leberregeneration inhibiert (Wang &

Lautt 1998). Ein reduzierter intrahepatischer Scherstress, wie wir ihn kürzlich in KC-depletierten Tieren nach PH aufzeigten, könnte daher eine mögliche Ursache für die gleichzeitig verminderte eNOS-Expression sein und folglich zur verzögerten Leberregeneration beitragen (**Abshagen et al. 2008**). Es konnten einige physiologische und pathophysiologische Stimuli identifiziert werden, welche die eNOS Expression modulieren. Dabei ist die Regulation der eNOS von mehreren molekularen Mechanismen abhängig, welche Protein-Interaktionen mit HSP90 (Hitzeschockprotein 90), Cav-1, Calmodulin sowie Serin-Phosphorylierungen beinhalten. Cav-1, das Strukturprotein der Caveolae, bindet die eNOS und verhindert so die Interaktion mit anderen Aktivator-molekülen, was zur eingeschränkten NO-Produktion bzw. eNOS-Aktivität und folglich zur Vasokonstriktion beiträgt (Shah et al. 1999). Des Weiteren wurde die Überexpression von Cav-1 mehrfach mit Stress-vermittelter eNOS-Inhibition in Zusammenhang gebracht (Yokomori et al. 2003; Ashburn et al. 2004). Die Bindung kann durch Kalzium-Einstrom und vermehrte Kalzium/Calmodulin Komplexe aufgehoben werden (Feron et al. 1998; Govers & Rabelink 2001). ET-1 selbst ist in der Lage, über den ET-B-Rezeptor die NO-Synthese zu induzieren sowie die Translokation der eNOS zur Zellmembran zu stimulieren (Merkel et al. 2005). Dies geschieht durch Aktivierung der kalziumabhängigen eNOS. Da NO infolge starken Scherstress die ET-1-Synthese inhibiert (Kuchan & Frangos 1993), handelt es sich hier wohl um einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Im Gegensatz dazu bewirkt schwacher Scherstress eine Stimulation der ET-1-Synthese (Milner et al. 1990). Im Modell der LPS-induzierten Sepsis konnte gezeigt werden, dass LPS die ET-1-induzierte eNOS-Aktivierung über einen negativen Feedback-Mechanismus inhibiert (Kamoun et al. 2006). Diese Inhibition ist mit einer Überexpression von Cav-1 und verstärkten Cav-1/eNOS-Interaktion assoziiert (Kamoun et al. 2006). Zudem lassen unsere Beobachtungen in KC-depletierten Tieren vermuten, dass KC auch durch die Regulation der Expression von Cav-1 bzw. der Cav-1/eNOS-Interaktion an der lokalen Kontrolle des hepatischen Blutflusses nach PH beteiligt sind (**Abshagen et al. 2008**). So konnten wir nach PH neben der verminderten eNOS-Proteinexpression eine erhöhte Cav-1 Expression in KC-depletierten Tieren beobachten (**Abshagen et al. 2008**). Obwohl viele der NF- $\kappa$ B-abhängigen Gene noch nicht bekannt sind, wurden einige vasoaktive und anti-apoptotische Gene identifiziert (Wang et al. 1998). So aktiviert NF- $\kappa$ B u.a. die induzierbare NO-Synthase (iNOS), was mit einer erhöhten NO-Produktion und Zytoprotektion einhergeht (Kim et al. 1997). Zudem zeigte Davis et al. (2004) in einer Studie, dass Scherstress die eNOS Transkription über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erhöht. Interessanterweise kann NO wiederum die NF- $\kappa$ B Aktivierung infolge von Scherstress hemmen. Grumbach et al. (2005) beschreiben dieses Phänomen als klassischen

negativen Rückkopplungsmechanismus, um die Zellen vor einer andauernden NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu bewahren. Basierend auf diesen Ergebnissen und Beobachtungen in KC-depletierten Tieren kann vermutet werden, dass die Interaktionen zwischen Scherstress, NF- $\kappa$ B und eNOS Expression maßgeblich von einer intakten KC-Funktion abhängen und Grundlage für eine adäquate hepatische Mikrozirkulation und somit Regeneration nach PH darstellen (**Abshagen et al. 2007, 2008**).

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit präsentiert umfassende Daten zur hepatischen Architektur, Mikrozirkulation und zellulären Integrität während des Regenerationsprozesses nach 70%-iger Leberresektion. Im Modell der PH wird in der Restleber eine regenerative Antwort induziert, wobei es bereits innerhalb einer Stunde zur verstärkten Transkription zahlreicher Gene kommt, deren Expression in normalem Lebergewebe nicht oder nur in geringem Maße nachweisbar ist. Die frühen physiologischen Mechanismen, welche die kompensatorische Leberregeneration nach PH auslösen, sind Gegenstand derzeitiger Forschung. Diskutiert werden metabolische und hämodynamische Faktoren. Die Bedeutung der KC in diesem Prozess ist bisher kontrovers diskutiert und nur unzureichend verstanden.

Mit der vorliegenden Studie wurde eine entscheidende Rolle der KC für die Regulation des Regenerationsprozesses deutlich. So konnten wir zeigen, dass die Stimulation der hepatozellulären Proliferation maßgeblich von einer intakten KC-spezifischen NF- $\kappa$ B-Aktivität und nachfolgender Freisetzung pro-mitogener Stimuli, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, abhängt. Darüber hinaus scheinen die KC durch die Modulation vasoaktiver Enzymsysteme an der Regulation des intrahepatischen Blutflusses und des intravaskulären Scherstressses als Triggermechanismus der Leberregeneration beteiligt zu sein. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die KC eine duale Rolle in der Leberregeneration spielen, indem sie die zelluläre Proliferation einerseits direkt über humorale Faktoren und andererseits indirekt durch die Aufrechterhaltung einer adäquaten intrahepatischen Mikrozirkulation stimulieren.

Daher gilt es, die physiologischen Funktionen der KC im Rahmen von Leberresektionen und -transplantationen zu bewahren. So sollten z.B. starke intraoperative Manipulationen des Lebergewebes als auch lange Ischämiezeiten, welche allesamt zur KC-Dysfunktion führen, vermieden werden. Im Fall kompromittierter Proliferation könnte die Leberregeneration via Modulation der KC-Funktion mittels zellstabilisierender Substanzen, z.B. vor der Organentnahme mittels Glycin, stimuliert werden. Des Weiteren könnte die zusätzliche Gabe von spezifischen Wachstumsfaktoren, welche die Rekrutierung neuer KC und Aktivierung bereits vorhandener KC bewirken, den Regenerationsprozess positiv beeinflussen.

## 6 Literatur

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. Kupffer Cells Are Mandatory for Adequate Liver Regeneration by Mediating Hyperperfusion via Modulation of Vasoactive Proteins. *Microcirculation* **2008**;15:37-47.

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. Loss of NF-kappaB activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2007**;292:1570-1577.

**Abshagen K**, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res* **2006**;134:354-362.

Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, and Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992;263:579-585.

Albrecht JH, Poon RY, Ahonen CL, Rieland BM, Deng C, Crary GS. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* 1998;16:2141-2150.

Argast GM, Campbell JS, Brooling JT, Fausto N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* 2004;279:34530-34536.

Arvidsson D, Svennson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol* 1988;254:471-476.

Ascher NL, Lake JR, Emond JC, Roberts JP. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Arch Surg* 1993;128:677-682.

Ashburn JH, Baveja R, Kresge N, Korneszczyk K, Keller S, Karaa A, Yokoyama Y, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Remote trauma sensitizes hepatic microcirculation to endothelin via caveolin inhibition of eNOS activity. *Shock* 2004;22:120-130.

Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 1997;26:945-952.

Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995;15:85-91.

Baier PK, Baumgartner U, Hempel S, Wolff-Vorbeck G, von Dobschuetz E, Hopt UT. Kupffer cells infiltrate liver tissue early after ischemia-reperfusion and partial hepatectomy. *Eur Surg Res* 2005;37:290-297.

Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A. The role of hepatic stellate cells in liver regeneration. *J Hepatol* 2004;40:1023-1026.

Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:749-758.

Bauer M, Paquette NC, Zhang JX, Bauer I, Pannen BH, Kleeberger SR, Clemens MG. Chronic ethanol consumption increases hepatic sinusoidal contractile response to endothelin-1 in the rat. *Hepatology* 1995;22:1565-1576.

Bhatnagar R, Schirmer R, Ernst M, Decker K. Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells in vitro. *Eur J Biochem* 1981;119:171-175.

Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:447-455.

Black D, Lyman S, Heider TR, Behrns KE. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *J Surg Res* 2004a;117:306-315.

Black D, Bird MA, Hayden M, Schrum LW, Lange P, Samson C, Hatano E, Rippe RA, Brenner DA, Behrns KE. TNF alpha-induced hepatocyte apoptosis is associated with alterations of the cell cycle and decreased stem loop binding protein. *Surgery* 2004b;135:619-628.

Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003;38:674-682.

Bolesta S, Haber SL. Hepatotoxicity associated with chronic acetaminophen administration in patients without risk factors. *Ann Pharmacother* 2002;36:331-333.

Boulton R, Woodman A, Calnan D, Selden C, Tam F, Hodgson H. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1alpha and -1beta: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1997;26:49-58.

Boulton RA, Alison MR, Golding M, Selden C, Hodgson HJ. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol* 1998;29:271-280.

Bouwens L, Wisse E. Pit cells in the liver. *Liver* 1992;12:3-9.

Bouwens LM, Baekeland M, Wisse E. Importance of local proliferation in the expanding Kupffer cell population of rat liver after zymosan stimulation and partial hepatectomy. *Hepatology* 1984;4:213-219.

Braet F, Shleper M, Paizi M, Brodsky S, Kopeiko N, Resnick N, Spira G. Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress in vitro. *Comp Hepatol* 2004;3:7.

Broelsch CE, Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Baker AL, Lichtor JL. Application of reduced-size liver transplants as split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplants. *Ann Surg* 1990;212:368-375.

Broering DC, Hillert C, Krupski G, Fischer L, Mueller L, Achilles EG, Schulte am Esch J, Rogiers X. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2002;6:905-913.

Brucoleri A, Gallucci R, Germolec DR, Blackshear P, Simeonova P, Thurman RG, Luster MI. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 1997;25:133-141.

Budny T, Palmes D, Stratmann U, Minin E, Herbst H, Spiegel HU. Morphologic features in the regenerating liver-a comparative intravital, lightmicroscopical and ultrastructural analysis with focus on hepatic stellate cells. *Virchows Arch* 2007;451:781-791.

Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W, Decker K. Interleukin-6 release by rat liver macrophages. *J Hepatol* 1990;11:367-373.

Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, Argast GM, Heinrich PC, Fausto N. Expression of suppressor of cytokine signalling during liver regeneration. *J Clin Invest* 2001;107:1285-1292.

Cantré D, Schuett H, Hildebrandt A, Dold S, Menger MD, Vollmar B, Eipel C. Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg* 2008 (in press).

Carr BI, Hayashi I, Branum EL, Moses HL. Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res* 1986;46:2330-2334.

Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 2002;110:193-202.

Chen MF, Hwang TL, Hung CF. Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Ann Surg* 1991;213:227-229.

Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007;356:1545-1559.

Columbano A, Shinozuka H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J* 1996;10:1118-1128.

Cornelius CE, Arias IM. Animal model of human disease. Crigler-Najjar Syndrome. Animal model: hereditary nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Am J Pathol* 1972;69:369-372.



- Cornell RP. Restriction of gut-derived endotoxin impairs DNA synthesis for liver regeneration. *Am J Physiol* 1985;249:563-569.
- Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089-1095.
- Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 1995;21:1443-1449.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379-1383.
- Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993;143:1606-1620.
- Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 2004;279:163-168.
- Decker K, Keppler D. Galactosamine induced liver injury. *Prog Liver Dis* 1972;4:183-199.
- Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-261.
- Diehl AM, Rai RM. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J* 1996;10:215-227.
- Diehl AM, Yin M, Fleckenstein J, Yang SQ, Lin HZ, Brenner DA, Westwick J, Bagby G and Nelson S. Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol* 1994;267:552-561.
- Diehl AM. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin Biochem* 1999;32:571-578.
- Diehl AM. Nutrition, hormones, metabolism, and liver regeneration. *Semin Liver Dis* 1991;11:315-320.
- Ding H, Peng R, Reed E, Li QQ. Effects of Kupffer cell inhibition on liver function and hepatocellular activity in mice. *Int J Mol Med* 2003;12:549-557.
- Duncan JR, Hicks ME, Cai SR, Brunt EM, Ponder KP. Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology* 1999;210:467-477.
- Eakes AT, Olson MS. Regulation of endothelin synthesis in hepatic endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:1068-1076.
- EGUCHI S, Yanaga K, Sugiyama N, Okudaira S, Furui J, Kanematsu T. Relationship between portal venous flow and liver regeneration in patients after living donor right-lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 2003;9:547-551.
- Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:769-776.
- Eipel C, Kidess E, Abshagen K, LeMinh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2007;151:406-413.
- Ekataksin W, Kaneda K. Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Semin Liver Dis* 1999;19:359-382.
- El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necroptosis. *Hepatology* 2004;39:1553-1562.
- Emond JC, Rosenthal P, Roberts JP, Stock P, Kelley S, Gregory G, Lim RC Jr, Ascher NL. Living related donor liver transplantation: the UCSF experience. *Transplant Proc* 1996;28:2375-2377.



- Emond JC, Whittington PF, Broelsch CE. Overview of reduced-size liver transplantation. *Clin Transplant* 1991;5:168-173.
- Farrell GC. Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology* 2004;40:1252-1255.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:45-53.
- Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1527-1536.
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487.
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
- Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transplantation* 2001;7:835-844.
- Fernandez MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, Nixon SJ, Ferguson C, Kurzchalia T, Tebar F, Enrich C, Parton RG, Pol A. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 2006;313:1628-1632.
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 1998;273:3125-3128.
- FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ* 1995;6:417-427.
- Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L, Carr BI, Sun D, Porter KA, Van Thiel DH, Starzl TE. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology* 1994;19:210-216.
- Fraser R, Bowler LM, Day WA. Damage of rat liver sinusoidal endothelium by ethanol. *Pathology* 1980;12:371-376.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002;36:653-659.
- Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M, Durham SK, Bruno MK, Cohen SD, Gordon MK, Gerecke DR, Zhou P, Laskin DL. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;184:27-36.
- Gertsch P, Stipa F, Ho J, Yuen ST, Luk I, Lauder IJ. Changes in hepatic portal resistance and in liver morphology during regeneration: in vitro study in rats. *Eur J Surg* 1997;163:297-304.
- Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P. Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res* 2005a;37:335-341.
- Glanemann M, Schirmeier A, Lippert S, Langrehr JM, Neuhaus P, Nussler AK. Cobalt-protoporphyrin induced heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration. *Transplant Proc* 2005b;37:3223-3225.
- Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998;101:604-612.
- Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:193-206.
- Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003;16:99-102.
- Gressner AM (2003). Leber. In: Renz H (Hrsg.): Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Verlag de Gruyter, Berlin; S.387-423.

Grewe M, Duyster J, Dieter P, Henninger H, Schulze-Specking A, Decker K. Prostaglandin D2 and E2 syntheses in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide and phorbol ester. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:655-664.

Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962;22:842-849.

Groner W, Winkelman JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999;5:1209-1212.

Grumbach IM, Chen W, Mertens SA, Harrison DG. A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:595-603.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999;19:5785-5799.

Hata S, Namae M, Nishina H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ* 2007;49:163-170.

Hayashi H, Nagaki M, Imose M, Osawa Y, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T, Kato T, Moriwaki H. Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Liver Int* 2005;25:162-170.

Higgins GM, and Anderson RM. Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999;19:2690-2698.

Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K. Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl.)* 1995;195:125-144.

Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJ, Boscá L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995;21:776-786.

Iakova P, Awad SS, Timchenko NA. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* 2003;113:495-506.

Ibrahim S, Chen CL, Wang CC, Wang SH, Lin CC, Liu YW, Yang CH, Yong CC, Concejero A, Cheng YF. Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg* 2005;29:1658-1666.

Ido A, Moriuchi A, Kim I, Numata M, Nagata-Tsubouchi Y, Hasuike S, Uto H, Tsubouchi H. Pharmacokinetic study of recombinant human hepatocyte growth factor administered in a bolus intravenously or via portal vein. *Hepatol Res* 2004;30:175-181.

Imuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, and Brenner DA. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998;101:802-811.

Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, Iwahara S, Ramadori G, Fahimi HD. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1621-1631.

Irmischer J, Johne R (1982). *Lexikon der Antike*. VEB Bibliographisches Institut Leipzig.

Iwai M, Cui TX, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine* 2001;13:60-64.

Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* 2006;43:474-484.

Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 1982;2:385-395.

Junqueira LC, Carneiro J (1989): *Leber*. In: Junqueira LC, Carneiro J (Hrsg.): *Histologie*. Springer Verlag, Berlin; S.531- 564.

- Kahn D, van Hoorn-Hickmann R, Terblanche J. Liver blood flow after partial hepatectomy in the pig. *J Surg Res* 1984;37:290-294.
- Kamoun WS, Karaa A, Kresge N, Merkel SM, Korneszczyk K, Clemens MG. LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1. *Hepatology* 2006;43:182-190.
- Kawada N, Klein H, Decker K (1993). Concentration and relaxation of hepatic stellate cells in culture. In: Wisse E, Knook DL (eds.): *Cells of the hepatic sinusoid*, Vol 4. The Netherlands. The Kupffer Cell Foundation, Leiden; pp161-164.
- Kawai M, Naruse K, Komatsu S, Kobayashi S, Nagino M, Nimura Y, Sokabe M. Mechanical stress-dependent secretion of interleukin 6 by endothelial cells after portal vein embolization: clinical and experimental studies. *J Hepatol* 2002;37:240-246.
- Keller HP, Lanz U. Objective control of replanted fingers by transcutaneous partial O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) measurements. *Microsurgery* 1984;5:85-89.
- Kim YH, Lee SM. Role of Kupffer cells in the vasoregulatory gene expression during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res* 2004;27:111-117.
- Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997;272:1402-1411.
- Komatsu H, Koo A, Guth PH. Leucocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. *Microvasc Res* 1990;40:1-13.
- Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003;197:634-659.
- Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:556-562.
- Krstic` RV (1991). *Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; pp224- 239.
- Kubo Y, Yasunaga M, Masuhara M, Terai S, Nakamura T, Okita K. Hepatocyte proliferation induced in rats by lead nitrate is suppressed by several tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibitors. *Hepatology* 1996;23:104-114.
- Kuchan MJ, Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;264:150-156.
- Kuebler WM, Parthasarathi K, Wang PM, Bhattacharya J. A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *J Clin Invest* 2000;105:905-913.
- Lambotte L, Li B, Leclercq I, Sempoux C, Saliez A, Horsmans Y. The compensatory hyperplasia (liver regeneration) following ligation of a portal branch is initiated before the atrophy of the deprived lobes. *J Hepatol* 2000;32:940-945.
- Lee CM, Yeoh GC, Olynyk JK. Differential effects of gadolinium chloride on Kupffer cells *in vivo* and *in vitro*. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:481-488.
- Lee SS, Hadengue A, Girod C, Braillon A, Lebrech D. Reduction of intrahepatic vascular space in the pathogenesis of portal hypertension. *In vitro* and *in vivo* studies in the rat. *Gastroenterology* 1987;93:157-161.
- Lehnert T, Golling M. Indikation und Ergebnisse der Lebermetastasenresektion. *Der Radiologe* 2001;41:40-48.
- Lehr HA, Vollmar B, Vajcoczy P, Menger MD. Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Methods Enzymol* 1999;300:462-481.
- Leist M, Gantner F, Jilg S, Wendel A. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol* 1995;154:1307-1316.
- Leonard AG, Brennen MD, Colville J. The use of continuous temperature monitoring in the postoperative management of microvascular cases. *Br J Plast Surg* 1982;35:337-342.

- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006;312:104-107.
- Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001;33:1377-1386.
- Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:389-396.
- Liebich HG (1999). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlag, 3. Aufl., Stuttgart, New York; pp218- 228.
- Liu KX, Kato Y, Yamazaki M, Higuchi O, Nakamura T, Sugiyama Y. Decrease in the hepatic clearance of hepatocyte growth factor in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Hepatology* 1993;17:651-660.
- Mabuchi A, Mullaney I, Sheard PW, Hessian PA, Mallard BL, Tawadrous MN, Zimmermann A, Senoo H, Wheatley AM. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2004;40:910-916.
- Macias-Silva M, Li W, Leu JI, Crissey MA, Taub R. Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:28483-28490.
- Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005;121:977-990.
- Maher JJ. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. *J Clin Invest* 1993;91:2244-2252.
- Maione D, Di Carlo E, Li W, Musiani P, Modesti A, Peters M, Rose-John S, Della Rocca C, Tripodi M, Lazzaro D, Taub R, Savino R, Ciliberto G. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J* 1998;17:5588-5597.
- Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:425-431.
- Mann DV, Lam WW, Hjelm NM, So NM, Yeung DK, Metreweli C, Lau WY. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. *Hepatology* 2001;34:557-565.
- Markus PM, König S, Liersch T, Becker H. Die Leberregeneration. *Onkologe* 2000;6:348-355.
- Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993;143:949-958.
- Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:1401-1410.
- Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2008;28:3-11.
- Matsuoka M, Pham NT, Tsukamoto H. Differential effects of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta 1 on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver* 1989;9:71-78.
- McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000;20:3-7.
- Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Yang SQ, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, van Lambalgen AA, Dijkstra CD, van Leeuwen PA. Kupffer cell depletion by Cl2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 2000;20:66-77.
- Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993;14:519-522.
- Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991;23:158-169.

- Menger MD, Vollmar B. In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery* 1994;15:383-389.
- Merkel SM, Kamoun W, Karaa A, Korneszczyk K, Schrum LW, Clemens MG. LPS inhibits endothelin-1-mediated eNOS translocation to the cell membrane in sinusoidal endothelial cells. *Microcirculation* 2005;12:433-442.
- Messmer K, Krombach F. Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg* 1998;69:333-338.
- Michalopoulos GK and DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
- Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 2005;128:503-506.
- Michalopoulos GK. Control mechanisms of liver regeneration. *J Gastroenterol* 1994;29:23-29.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007;213:286-300.
- Milner P, Bodin P, Loesch A, Burnstock G. Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:649-656.
- Mitchell C, Nivison M, Jackson LF, Fox R, Lee DC, Campbell JS, Fausto N. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005;280:2562-2568.
- Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, Berger ED, Lauchart W, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Look J, Löhr JM, Liebe S, Emmrich J, Korten G, Schmidt R. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl* 2000;6:277-286.
- Mohammed FF, Khokha R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* 2005;15:555-563.
- Morsiani E, Mazzoni M, Aleotti A, Gorini P, Ricci D. Increased sinusoidal wall permeability and liver fatty change after two-thirds hepatectomy: an ultrastructural study in the rat. *Hepatology* 1995;21:539-544.
- Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X. The induction of the immediate-early-genes EGR-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 2002;37:606-612.
- Mueller L, Grotelueschen R, Meyer J, Vashist YK, Abdulgawad A, Wilms C, Hillert C, Rogiers X, Broering DC. Sustained function in atrophying liver tissue after portal branch ligation in the rat. *J Surg Res* 2003;114:146-155.
- Nagase S, Shimamune K, Shumiya S. Albumin-deficient rat mutant. *Science* 1979;205:590-591.
- Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, Hayakawa N, Kanai M, Nimura Y. Complications of hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2001;25:1277-1283.
- Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:16-28.
- Nakamura T. Hepatocyte growth factor as mitogen, motogen and morphogen, and its roles in organ regeneration. *Princess Takamatsu Symp* 1994;24:195-213.
- Nakata K, Leong GF, Brauer RW. Direct measurement of blood pressures in minute vessels of the liver. *Am J Physiol* 1960;199:1181-1188.
- Niia T, Murakami M, Aoki T, Murai N, Shimizu Y, Kusano M. Immediate increase of portal pressure, reflecting sinusoidal shear stress, induced liver regeneration after partial hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999;6:275-280.
- Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995;15:244-249.

- Oda M, Yokomori H, Han JY. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003;29:167-182.
- Oda M, Yokomori H, Han JY. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculatory hemodynamics: hepatic arterial system. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;34:11-26.
- Ogawa K, Medline A, Farber E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Br J Cancer* 1979;40:782-790.
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M, Grompe M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am J Pathol* 1999;155:2135-2143.
- Palmes D, Minin E, Budny T, Uhlmann D, Armann B, Stratmann U, Herbst H, Spiegel HU. The endothelin/nitric oxide balance determines small-for-size liver injury after reduced-size rat liver transplantation. *Virchows Arch* 2005;447:731-741.
- Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004;25:1601-1611.
- Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997;121:142-149.
- Pannen BH, Bauer M, Zhang JX, Robotham JL, Clemens MG. A time-dependent balance between endothelins and nitric oxide regulating portal resistance after endotoxin. *Am J Physiol* 1996;271:1953-1961.
- Pannen BH, Bauer M. Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci* 1998;62:2025-2033.
- Paxian M, Rensing H, Rickauer A, Schönhofen S, Schmeck J, Pannen BH, Bauer I, Bauer M. Kupffer cells and neutrophils as paracrine regulators of the heme oxygenase-1 gene in hepatocytes after hemorrhagic shock. *Shock* 2001;15:438-445.
- Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001;34:688-693.
- Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 1999;20:501-534.
- Pistoi S, Morello D. Liver regeneration 7: Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *FASEB J* 1996;10:819-828.
- Plümpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, Manns MP, Trautwein C. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:173-183.
- Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD. Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992;16:803-809.
- Raab R, Schlitt HJ, Oldhofer R. Technik der Leberresektion. *Chir Gastroenterol* 1998;14:213-218.
- Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81:145-157.
- Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, Liew FY, Zaragoza C, Lowenstein C, Diehl AM. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13829-13834.
- Rai RM, Loffreda S, Karp CL, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology* 1997;25:889-895.
- Rai RM, Yang SQ, McClain C, Karp CL, Klein AS, Diehl AM. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol* 1996;270:909-918.
- Rappaport AM. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Pathol* 1976;157:215-243.



- Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 1973;6:212-228.
- Rappaport AM. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 1958;130:673-689.
- Reynaert H, Chavez M, Geerts A. Vascular endothelial growth factor and liver regeneration. *J Hepatol* 2001;34:759-761.
- Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994;263:1149-1152.
- Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4942-4946.
- Rocheleau B, Ethier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol* 1999;277:1000-1007.
- Rodriguez G, Lorente L, Durán HJ, Aller MA, Arias J. A 70% hepatectomy in the rat using a microsurgical technique. *Int Surg* 1999;84:135-138.
- Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, Russell WE, Whitehead R, Parks WT, Holdren MS, Her MF, Gautam S, Magnuson M, Moses HL, Grady WM. Inactivation of TGF-beta signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene* 2005;24:3028-3041.
- Rozga J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit* 2002;8:32-38.
- Runge D, Runge DM, Jäger D, Lubecki KA, Beer Stolz D, Karathanasis S, Kietzmann T, Strom SC, Jungermann K, Fleig WE, Michalopoulos GK. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:46-53.
- Russell WE, Coffey RJ Jr, Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5126-5130.
- Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol Carcinog* 1996;15:183-189.
- Rüttinger D, Vollmar B, Wanner GA, Messmer K. In vivo assessment of hepatic alterations following gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade. *J Hepatol* 1996;25:960-967.
- Saba TM. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Arch Intern Med* 1970;126:1031-1052.
- Sakamoto T, Ezure T, Lunz J, Murase N, Tsuji H, Fung JJ, Demetris AJ. Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2000;32:256-267.
- Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403-411.
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2572-2576.
- Sasse D, Spornitz UM, Maly IP. Liver architecture. *Enzyme* 1992;46:8-32.
- Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003;28:105-112.
- Sato Y, Koyama S, Tsukada K, Hatakeyama K. Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Today* 1997;27:518-526.
- Sato Y, Tsukada K, Hatakeyama K. Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy. *Surg Today* 1999;29:1-9.

- Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J* 2003;17:660-667.
- Scheele J. Anatomical and atypical liver resections. *Chirurg* 2001;72:113-124.
- Schiff L, Schiff ER (1993). Diseases of the liver. Lippincott Company, Philadelphia, Vol.1; pp1-41.
- Schirmacher P, Peters M, Ciliberto G, Blessing M, Lotz J, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. *Am J Pathol* 1998;153:639-648.
- Schoen JM, Lautt WW. Nitric oxide potentiates C-Fos mRNA expression after 2/3 partial hepatectomy. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:47-48.
- Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lautt WW: Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 2001;5:453-464.
- Schoen Smith JM, Lautt WW. Nitric oxide and prostaglandins potentiate the liver regeneration cascade. *Can J Gastroenterol* 2006;20:329-334.
- Seiler CA, Redaelli C, Schmied BM, Baer HU, Büchler MW. [Liver resection for liver metastases--1998 Bern Symposium]. *Swiss Surg* 2000;6:164-168.
- Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, Kishimoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41:443-450.
- Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999;30:469-475.
- Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien PA: ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 2003;124:692-700.
- Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:3-15.
- Sérandour AL, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Théret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. TNFalpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005;41:478-486.
- Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-1228.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.
- Shimizu H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:7254-7260.
- Shiota G, Wang T, Nakamura T, Schmidt E. Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 1994;19:962-972.
- Skullman S, Ihse I, Larsson J. Influence of malnutrition on regeneration and composition of the liver in rats. *Acta Chir Scand* 1990;156:717-722.
- Sonin NV, Garcia-Pagan JC, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1999;11:175-179.
- Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care* 2004;8:462-468.
- Starzl TE, Watanabe K, Porter KA, Putnam CW. Effects of insulin, glucagon, and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs. *Lancet* 1976;1:821-825.



Steer CJ. Liver regeneration. *FASEB J* 1995;9:1396-1400.

Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* 2003;198:913-923.

Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11181-11186.

Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1333-1337.

Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S, Tsuchiya M. Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc Res* 1993;46:28-42.

Taira K, Hiroyasu S, Shiraishi M, Muto Y, Koji T. Role of the Fas system in liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *Eur Surg Res* 2001;33:334-341.

Takeda K, Togo S, Kunihiro O, Fujii Y, Kurosawa H, Tanaka K, Endo I, Takimoto A, Sekido H, Hara M, Shimada H. Clinicohistological features of liver failure after excessive hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2002;49:354-358.

Takei Y, Oshita M, Tsuji S, Hijioka T, Kawano S, Goto M, Masuda E, Fukui H, Nishimura Y, Fusamoto H, Kamada T (1993). Endothelin-1 and nitric oxide as mediators regulating sinusoidal tone in the presence of ethanol. In: Wisse E, Knook DL (eds.). *Cells of the hepatic sinusoid*, Vol 4. The Netherlands. The Kupffer Cell Foundation, Leiden; pp385-387.

Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 1999;62:413-422.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:836-847.

Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 1996;10:1249-1256.

Trautwein C, Rakemann T, Niehof M, Rose-John S, Manns MP. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* 1996;110:1854-1862.

Tucker ON, Heaton N. The "small for size" liver syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:150-155.

Um SH, Nishida O, Tokubayashi M, Kimura F, Takimoto Y, Yoshioka H, Inque R, Kita T. Hemodynamic changes after ligation of a major branch of the portal vein in rats: comparison with rats with portal vein constriction. *Hepatology* 1994;19:202-209.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995;269:1371-1378.

Uhlmann S, Uhlmann D, Spiegel HU. Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy. *J Invest Surg* 1999;12:179-93.

Van Bossuyt H, Bouwens L, Wisse E (1988). Isolation, purification and culture of sinusoidal liver cells. In: von Bioulac-Sage P, Balabaud C (eds.). *Sinusoids in human liver: health and disease*. Rijswijk, Netherlands. The Kupffer Cell Foundation, Leiden; pp1-16.

Van Rooijen N, Bakker J, Sanders A. Transient suppression of macrophage function by liposome-encapsulated drugs. *Trends Biotechnol* 1997;15:178-185.

Van Rooijen N, van Kesteren-Hendrikx E. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. *J Liposome Res* 2002;12:81-94.

Van Rooijen N. The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 1989;124:1-6.

Veihelmann A, Landes J, Hofbauer A, Dorger M, Refior HJ, Messmer K, Krombach F. Exacerbation of antigen-induced arthritis in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2001;44:1420-1427.

Vizzotto L, Romani F, Ferrario VF, Degna CT, Aseni P. Characterization by morphometric model of liver regeneration in the rat. *Am J Anat* 1989;185:444-454.

- Vogten JM, Smakman N, Voest EE, Borel Rinkes ICH. Intravital analysis of microcirculation in the regenerating mouse liver. *J Surg Res* 2003;113:264-269.
- Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1994a;267:786-793.
- Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 1994b;20:301-304.
- Vollmar B, Rücker M, Menger MD. A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide H33342. *Microvasc Res* 1996;51:250-259.
- Vonnanhne FJ (1993). *Die Leber des Menschen*. Verlag Karger, Basel; S.4-9.
- Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stolz DB. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001;33:363-378.
- Wake K, Sato T. Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res* 1993;273:227-237.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-1683.
- Wang HH, Lautt WW. Evidence of nitric oxide, a flow-dependent factor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:1072-1079.
- Webber EM, Bruix J, Pierce RH and Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998;28:1226-1234.
- Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 1994a;19:489-497.
- Webber EM, Wu JC, Wang L, Merlino G, Fausto N. Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am J Pathol* 1994b;145:398-408.
- Webster MH, Patterson J. The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 1976;29:182-185.
- Weglarz TC, Degen JL, Sandgren EP. Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. *Am J Pathol* 2000;157:1963-1974.
- Westwick JK, Weitzel C, Minden A, Karin M, Brenner DA. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J Biol Chem* 1994;269:26396-26401.
- White P, Brestelli JE, Kaestner KH, Greenbaum LE. Identification of transcriptional networks during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005;280:3715-3722.
- Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* 1970;31:125-150.
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:1441-1446.
- Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 1998;28:959-970.
- Yamamoto H, Nimura Y, Yasui A, Moriura S, and Kato M. Changes in hepatic hemodynamics and oxygen consumption after partial hepatic congestion in dogs. *Eur Surg Res* 1992;24:169-179.
- Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, Kato T, Oriyama T, Fujimoto J, Furukawa K, Tanaka T, Tomoda F, Tanaka W. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* 1993;18:79-85.

Yang L, Magness ST, Bataller R, Rippe RA, Brenner DA. NF-kappaB activation in Kupffer cells after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:530-538.

Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Nomura M, Wakabayashi G, Kitajima M, Ishii H. Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide. *J Gastroenterol* 2003;38:854-860.

Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg* 2007;31:367-374.

Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, Chaudry IH. Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology. *J Surg Res* 2005;128:147-156.

Zajicek G, Oren R, Weinreb M Jr. The streaming liver. *Liver* 1985;5:293-300.

Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989;8:293-302.

Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994;266:624-632.

## 7 Abkürzungen

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AP-1	Activator Protein-1
$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell lymphoma-x <sub>L</sub>
BrdU	Bromdesoxyuridin
Cav-1	Caveolin-1
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenwasserstoff
c-met	Mesenchymal epithelial transition factor
CO	Kohlenmonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HB-EGF	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HO-1	Hämoxygenase-1
HSP90	Hitzeschockprotein 90
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
I- $\kappa$ B	Inhibitory-kappaB
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IVM	intravitale Multifluoreszenzmikroskopie
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KC	Kupffer Zelle
LPS	Lipopolysaccharid

---

MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MMP	Matrixmetalloproteinase
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappaB
NO	Stickstoffmonoxid
PH	partielle Hepatektomie
Rb	Retinoblastom Tumor Suppressor Protein
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signalling
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TAA	Thioacetamid
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor-alpha
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor-beta
TLR	Toll-like-Receptor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor-alpha
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vv.	Venae

## **8 Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 01.04.2008

## 9 Lebenslauf

### PERSON

Name: Kerstin Abshagen, geb. Dallmann  
Geburtsdatum: 03.04.1978  
Geburtsort: Kühlungsborn  
Adresse: Weidestrasse 10, Kröpelin  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind (geb. 2003)

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

1984 – 1991 Realschule Kröpelin  
1991 – 1996 Heinrich Schliemann-Gymnasium Neubukow  
1996 Abitur

### HOCHSCHULAUSBILDUNG

4/1997 – 4/2002 Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz Arndt-Universität Greifswald; Abschluss: Diplom-Humanbiologin  
Diplomarbeit: Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Greifswald  
Thema: „Charakterisierung eines unbekannten Proteins aus humanem Nierengewebe – Zellspezifität und intrazelluläre Lokalisation“

### WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

5/2002 – 10/2002 Koordinatorin des Graduiertenkollegs der Universität Greifswald  
11/2002 – 12/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Immunologie, Universität Rostock  
seit 2/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock  
1/2003 – 1/2004 Mutterschutz und Elternzeit

## 10 Publikationsverzeichnis

### ORIGINALARBEITEN (PEER-REVIEW)

**Dallmann K**, Junker H, Balabanov S, Zimmermann U, Giebel J, Walther R. Human agmatinase is diminished in the clear cell type of renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 108:342-347, 2004

**Abshagen K**, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res*. 134:354-362, 2006

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. Loss of NF- $\kappa$ B activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 292:G1570-1577, 2007

Eipel C, Kidess E, **Abshagen K**, LeMinh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*. 151:406-413, 2007

LeMinh K, Klemm K, **Abshagen K**, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and post-treatment of darbepoetin alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol*. 170:1954-1963, 2007

Eipel C, Hirschmann M, **Abshagen K**, Menger MD, Vollmar B. Local interaction of apoptotic hepatocytes and Kupffer cells in a rat model of systemic endotoxemia. *Hepatol Res*. 37:863-71, 2007

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B. Kupffer cells are mandatory for adequate liver regeneration by mediating hyperperfusion via modulation of vasoactive proteins. *Microcirculation*. 15:37-47, 2008

**Abshagen K**, Schrodi I, Gerber T, Vollmar B. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone<sup>®</sup>. *J Biomed Mater Res A*. 2008 (under review)



Klemm K, Eipel C, Cantré D, **Abshagen K**, Menger MD, Vollmar B. Multiple doses of erythropoietin impairs liver regeneration after partial hepatectomy by increasing TNF- $\alpha$ , the Bax to Bcl-xL ratio and apoptotic cell death. Ann Surg. 2008 (in submission)

Kuhla A, Eipel C, Siebert N, **Abshagen K**, Menger MD, Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNF $\alpha$ -dependent Fas/FasL cytotoxicity in a murine model of Gal/LPS-induced acute liver failure. J Hepatol. 2008 (in submission)

Le Minh K, Kuhla A, **Abshagen K**, Minor T, Stegemann J, Ibrahim S, Eipel C, Vollmar B. Uncoupling protein-2 deficiency provides protection in a murine model of acute liver failure. Crit Care Med. 2008 (in press)

## KONGRESSBEITRÄGE

**Dallmann K**, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. In vivo Analyse der hepatischen Architektur und Mikrozirkulation der regenerierenden Mausleber nach partieller Hepatektomie. Chir Forum. 34:241-242, 2005

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Vollmar B. Depletion der Kupfferzellen mittels Clodronat-Liposomen verzögert die Leberregeneration und beeinträchtigt die mikrovaskuläre Versorgung der regenerierenden Mausleber nach partieller Hepatektomie. Chir Forum. 35:301-302, 2006

Eipel C, Cantre D, **Abshagen K**, Glawe C, Schuett H, Vollmar B. Paradoxe Expression vasoregulativer Mediatoren in der small-for-size-Leber. Chir Forum. 35:257-258, 2006

Klemm K, Eipel C, **Abshagen K**, Vollmar B. Erythropoietin verbessert die Leberregeneration durch Stimulation der Zellproliferation und Inhibition der Zellapoptose. Chir Forum. 35:303-304, 2006

Traeger T, Mikulcak M, Eipel C, **Abshagen K**, Maier S, Heidecke CD, Vollmar B. Kupfferzelldepletion führt zur Reduktion von intrahepatischer Inflammation und hepatozellulärer Apoptose bei muriner polymikrobieller Sepsis. Chir Forum. 35:243-244, 2006

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Vollmar B. Bedeutung der Kupfferzell-abhängigen Regulation der mikrovaskulären Perfusion für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. Chir Forum. 36:7-8, 2007

Kidess E, Eipel C, **Abshagen K**, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase wirkt über NFkB-Inhibition anti-inflammatorisch, kann jedoch den apoptotischen Gewebeuntergang im murinen Modell des septischen Leberschadens nicht verhindern. Chir Forum. 36:203-204, 2007

Klemm K, Eipel C, LeMinh K, **Abshagen K**, Menger MD, Vollmar B. Erythropoietin inhibiert die Fas-vermittelte hepatozelluläre Apoptose. Chir Forum. 36:231-232, 2007

LeMinh K, Klemm K, **Abshagen K**, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Prophylaktische wie auch therapeutische Gabe von Darbepoetin wirkt anti-inflammatorisch und anti-apoptotisch im Modell des akuten septischen Leberschadens der Maus. Chir Forum. 36:205-206, 2007

Schrodi I, **Abshagen K**, Gerber T, Vollmar B. In vivo Analyse der Biokompatibilität und Gewebeintegration des synthetischen Knochenersatzstoffes NanoBone®. Chir Forum. 37:263-264, 2008

## ZITIERFÄHIGE ABSTRACTS

Eipel C, **Abshagen K**, Schuett H, Glawe C, Vollmar B. Paradoxe Expression vasoregulativer Mediatoren in der small-for-size-Leber. Transplantationsmedizin. Suppl II: 3, 2005

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Vollmar B. Kupffer cell depletion by clodronate-liposomes delays liver regeneration and impairs hepatic microcirculation after partial hepatectomy in mice. Eur Surg Res. 38:1-2, 2006

Cantré D, Eipel C, **Abshagen K**, Glawe C, Schuett H, Vollmar B. Paradoxical expression of vasoregulating mediators in the „small-for-size“-liver. Eur Surg Res. 38:6-7, 2006

Klemm K, Eipel C, **Abshagen K**, Vollmar B. Erythropoietin enhances liver regeneration in partially hepatectomized rats by stimulation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. Eur Surg Res. 38:46, 2006

Kidess E, Eipel C, **Abshagen K**, Sehnert B, Burckhardt H, Vollmar B. Therapy of liver failure in endotoxemic mice with antileukoproteinase. Eur Surg Res. 38:133, 2006

Mikulcak M, Traeger T, Eipel C, **Abshagen K**, Maier S, Heidecke CD, Vollmar B. Kupffer cell depletion reduces intrahepatic inflammation and hepatocellular apoptosis in murine polymicrobial sepsis. Eur Surg Res. 38:134-135, 2006

Schmidt A, Eipel C, **Abshagen K**, Ibrahim S, Menger MD, Vollmar B. Role of TNF-alpha-dependent Fas/FasL-cytotoxicity in Gal/LPS-induced acute liver failure in mice. Langenbecks Arch Surg. 392:787, 2007

## PREISE UND AUSZEICHNUNGEN

Nominierung für den Walter Brendel Award 2006

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Vollmar B. Kupffer cell depletion by clodronate-liposomes delays liver regeneration and impairs hepatic microcirculation after partial hepatectomy in mice. Eur Surg Res. 38:1-2, 2006

41<sup>st</sup> Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR)

Nominierung für den Fritz Linder Preis 2007

**Abshagen K**, Eipel C, Kalff JC, Vollmar B. Bedeutung der Kupfferzell-abhängigen Regulation der mikrovaskulären Perfusion für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. Chir Forum. 36:7-8, 2007

124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH)

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützten und mich auf dem Weg vom ersten Versuch bis zur Fertigstellung der Dissertation begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Überlassung eines hoch interessanten Themas bedanken. Ich danke ihr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, ihre stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, die wertvollen Ratschläge und großzügige Unterstützung zu jeder Zeit. Mit Geduld und konstruktiver Kritik lehrte sie mir wissenschaftliches Arbeiten und die kritische Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Besonders auch bei der Vorbereitung von Vorträgen oder Kongressbeiträgen unterstützte sie mich mit Geduld und wertvoller Hilfe. Von ihrem Wissen, ihrem Scharfsinn und ständiger Hilfsbereitschaft habe ich enorm profitieren dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff, von der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung der Clodronat-Liposomen und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dietmar Schiffmann, der diese Arbeit gegenüber der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock vertreten hat.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie für die langjährige hilfsbereite Unterstützung auf allen Ebenen und die tolle Zusammenarbeit sowie für ein außergewöhnlich gutes Arbeitsklima bedanken.

Mein ganz herzlicher und besonderer Dank gilt meinem Kollegen Dr. rer. nat. Christian Eipel, für die Einarbeitung, für seine hilfreichen fachlichen Ratschläge und vor allem für seine immer wieder motivierenden und aufmunternden Worte. Sein Ideengut und die zahllosen fruchtbaren Diskussionen waren eine Bereicherung für diese Arbeit.

Dank gebührt auch meinen Kollegen Dr. rer. nat. Angela Kuhla, Dr. med. Heiko Sorg und Dr. rer. nat. Nikolai Siebert für Diskussionen, technische Hilfe, die zahlreichen Impulse während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit und den Spaß, den wir oft hatten.

Schließlich danke ich herzlichst der Sekretärin Anja Gellert und allen medizinisch-technischen Assistentinnen, namentlich Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz und Maren Nerowski für ihr fachkundiges Engagement bei der Aufarbeitung der

Gewebeproben sowie für zahlreiche wertvolle Hinweise und Hilfestellungen. Die Arbeit im Labor und ebenso die zahlreichen schönen Stunden nach der Arbeit mit euch haben immer viel Spaß gemacht.

Ein großer Dank geht auch an York Yannikos für die notwendige Hilfe bei Computer-Problemen, durch seine Geduld war es möglich, die vielen softwaretechnischen Probleme zu überwinden.

Den Mitarbeitern der Zentralen Versuchstierhaltung danke ich für die freundliche Unterstützung und Betreuung der Versuchstiere, insbesondere danke ich Katrin Sievert-Küchenmeister für die regelmässige Mithilfe bei den tierexperimentellen Versuchen.

Meinen größten Dank gebührt aber meiner Familie, besonderes meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle für Ihre Liebe, Vertrauen und grenzenlose Unterstützung auf allen meinen bisherigen Wegen herzlichst danken. Nicht allein meine Arbeit, sondern auch meine Familie hat mich immer wieder motiviert. Mein Ehemann Marco und mein Sohn Tim haben mir das Gleichgewicht wieder zurückgegeben, dass man braucht, um wieder frisch an die Arbeit zu gehen.

Vielen Dank!

Die Eigenanteile der Veröffentlichungen der vorliegenden Dissertation sind wie folgt:

An der Versuchsplanung war ich beteiligt, die gesamten Tierexperimente als auch die nachfolgende quantitative Analyse der *in vivo* erfassten Daten erfolgten ausschließlich durch mich. An der histologischen und molekularbiologischen Aufarbeitung und Analyse der Proben war ich maßgeblich beteiligt. Die quantitative Auswertung dieser Daten erfolgte ausschließlich durch mich. An der Interpretation der Daten und Erstellung der Manuskripte waren neben mir die anderen Coautoren beteiligt.

## Comprehensive Analysis of the Regenerating Mouse Liver: An *In Vivo* Fluorescence Microscopic and Immunohistological Study

Kerstin Abshagen,\* Christian Eipel, Ph.D.,\* Michael D. Menger, M.D.,† and Brigitte Vollmar, M.D.\*<sup>1</sup>

\*Department of Experimental Surgery, University of Rostock, Rostock, Germany; †Institute of Clinical & Experimental Surgery, University of Saarland, Homburg-Saar, Germany

Submitted for publication October 30, 2005

**Background.** Regeneration of tissue is a fundamental parameter of the liver's response to injury and is essential for post-operative recovery from hepatic resection. An adequate microvascular supply of both remnant tissue and newly formed cell clusters is necessary for the accurate restoration of the organ. However, a comprehensive analysis of hepatic architecture and microcirculation during liver regeneration is missing.

**Methods.** Using intravital high resolution multifuorescence microscopy and histological techniques we analyzed the regenerating liver of mice at days 3, 5, and 8 after 68% hepatectomy.

**Results.** Within the 8-day course of regeneration, liver weight restored to ~90% of its original mass. During the 8-day period of observation density of hepatocytes and Ito cells was constantly found reduced from 4,200 and 800 cells/mm<sup>2</sup> in non-hepatectomized control livers to ~2,500 and ~500 cells/mm<sup>2</sup>. A transient decline of sinusoidal density was partly compensated by recruiting all sinusoids for perfusion with a final perfusion index of 79, 89, and 98% at days 3, 5, and 8 after resection. Increase of sinusoidal diameters preserved functional vessel area after resection, guaranteeing an adequate tissue oxygenation, as verified by low parenchymal NADH autofluorescence. The number of PCNA expressing hepatocytes rose 11-, 4-, and 2-fold at days 3, 5, and 8 after resection, followed by a maximum proliferation of sinusoidal lining cells at day 5. Cell apoptosis slightly increased, most probably in response to the restoration and to eliminate redundant cells. Liver regeneration was not associated with enhanced leukocyte-endothelial cell interaction, disproving inflammation as a relevant trigger for the regeneration.

<sup>1</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Department of Experimental Surgery, University of Rostock, 18055 Rostock, Germany. E-mail: brigitte.vollmar@med.uni-rostock.de.

**Conclusion.** The present data contribute to a better understanding of the complex vascular and cellular mechanisms during liver regeneration to develop strategies fighting against impeded liver growth. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Key Words:** intravital fluorescence microscopy; hepatocytes; Ito cells; sinusoids; apoptosis; proliferating cell nuclear antigen.

### INTRODUCTION

After the resection of hepatic tissue, the remnant parenchyma undergoes a nearly complete restoration of mass and function within a certain time period. This ability is remarkable, as hepatocytes normally are in a quiescent, highly differentiated state and rarely divide. With removal of liver mass, hepatocytes are immediately activated and reenter into the cell cycle after approximately 24 h. DNA-synthesis and cell mitosis of non-parenchymal cells lag that of hepatocytes by about 24 h [1]. The kinetics imply that hepatocytes provide the mitogenic stimuli that lead to the proliferation of other cells, such as biliary epithelial cells, Kupffer and Ito cells, as well as endothelial lining cells. Proliferation of all these cells is necessary to rebuild the lost hepatic tissue.

There is an unequivocal body of evidence that liver regeneration reveals an orchestrated response involving sequential changes in gene expression, cytokine and growth factor production as well as in morphological structure [2–6]. In contrast to the detailed dissection of the molecular and humoral biology of liver regeneration [3, 7, 8], the morphological modifications during the restoration of liver tissue mass indeed have been fully recognized, yet, not comprehensively studied. Most of the reports available are based on histological, immunohistochemical, electron microscopical,



and autoradiographical techniques [9–12], which are suited for neither the investigation of dynamic changes in microvascular structure and function nor the direct assessment of the interplay between liver microcirculation, tissue morphology and cell integrity. Contrary to that, the technique of *in vivo* fluorescence microscopy is useful for simultaneous and serial *in vivo* analysis of morphological, microvascular, and cellular aspects and their relationship in consecutive stages of hepatic pathophysiology, such as liver fibrosis and cirrhosis [13]. In the present study, we therefore combined several approaches by intravital multifluorescence microscopy in a mouse model of partial hepatectomy to provide a complete and comprehensive view on microvascular, cellular and functional aspects during the process of liver regeneration.

## MATERIALS AND METHODS

### Liver Regeneration Model

Upon approval by the local government, all experiments were performed in accordance with the German legislation on protection of animals and the National Institutes of Health 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council; NIH publication 86-23 revised 1985). Female C57BL/6J mice (10–12 week old, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were anesthetized by breathing isoflurane (1.5 vol%) and subjected to a hepatectomy of 68% [14]. The animals were placed in supine position and a median laparotomy was followed by retraction of the xyphoid cartilage for an appropriate exposure of the liver and transection of hepatic ligaments. The lobus sinister lateralis, lobus sinister medialis, and lobus dexter medialis were resected by placing 4-0 silk suture ties as proximal to the origin of the lobes as possible. After removing the tied lobes and irrigating the abdomen with warm saline, the peritoneum and the skin were closed with running 6-0 and 5-0 sutures, respectively. Subcutaneous 5 ml-depots of physiological saline served as volume replacement. The animals were allowed to recover from anesthesia and surgery under a red warming lamp and were held in single cages until the subsequent experiments followed at post-operative days 3, 5, and 8 ( $n = 6$  animals per time point). Sham-operated animals without hepatic resection served as controls.

### Intravital Fluorescence Microscopy

Controls and animals with hepatectomy of 68% were anesthetized (ketamine/xylazine, 90/25 mg/kg body wt i.p.) and placed in supine position on a heating pad for maintenance of body temperature at 36 to 37°C. Polyethylene catheters (PE 50, ID 0.58 mm, Portex, Hythe, United Kingdom) in the right carotid artery and left jugular vein allowed for assessment of systemic hemodynamics and for the injection of fluorescent dyes. After laparotomy the animals were positioned on their right side and the caudate lobe was exteriorized on a plasticine stage, allowing an ideal placement of the tissue with a homogeneous focus level and minimal respiratory movement during the *in vivo* microscopic procedure. To keep the exteriorized liver moist and to exclude effects of ambient oxygen, the liver surface was covered with a glass slide. After the microscopy, liver tissue was sampled for subsequent histological and immunohistochemical analysis ( $n = 6$  animals per time point).

Using a fluorescence microscope equipped with a 100 W mercury lamp (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Germany) and different filter sets for blue (excitation/emission wavelength: 450–490 nm/>520 nm), green (530–560 nm/>580 nm) and ultraviolet (330–

380 nm/>415 nm) light epi-illumination, microscopic images were taken by a water immersion objective (x20/0.50W, Zeiss), recorded by a CCD video camera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Germany) and transferred to a video system (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokyo, Japan).

Before the injection of fluorescent dyes for *in vivo* microscopy of the hepatic microcirculation, microfluorographical images of the autofluorescence of the liver surface were taken [13]. The ultraviolet epi-illumination (330–380 nm/>415 nm) allowed the observation of multiple patchy fluorescent activities derived from vitamin A in Ito cells [13]. After complete elimination of vitamin A autofluorescence because of its rapid photobleaching property, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) autofluorescence of hepatic parenchymal tissue was monitored, serving as an indicator of the mitochondrial redox state and thus hepatic tissue oxygenation [15]. Using blue light epi-illumination sodium fluorescein (2  $\mu\text{mol/kg}$  i.v.; Merck, Darmstadt, Germany) served for enhancement of the tissue contrast enabling the assessment of sinusoidal perfusion within the individual microvessels [16–18]. Fluorescence microscopic analysis of the hepatic microcirculation further included the determination of sinusoidal diameters and RBC velocity ( $V_{\text{RBC}}$ ) as well as density and nutritive perfusion of sinusoids [16]. Rhodamine-6G (1  $\mu\text{mol/kg}$  i.v.; Merck) and green light epi-illumination allowed for *in vivo* staining of leukocytes with assessment of their flow behavior within the individual microvascular segments [16, 19]. For analysis of hepatocytes and apoptotic cell death, *in vivo* staining of hepatocellular nuclei was achieved by intravenous injection of bisbenzimidazole (Hoechst 33342; 10  $\mu\text{mol/kg}$ ; Sigma, St. Louis, MO) and ultraviolet epi-illumination [16, 20].

### Quantitative Video Analysis

Evaluation of hepatocellular and microcirculatory parameters was performed off-line by frame-to-frame analysis of the videotaped images at a magnification of 400-fold, using a computer-assisted image analysis system with a 19' monitor (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Germany).

Upon ultraviolet epi-illumination, Ito cell density was calculated by counting the number of Ito cells per observation area in 10 fields per animal (given as cells/mm<sup>2</sup> observation field). Ito cells were identified as intense areas of vitamin A autofluorescence, which rapidly faded upon ultraviolet epi-illumination. At first, 2 s after exposure to the epi-illumination Ito cells were counted in every microscopic survey [13]. After exposure of the individual fields for ~20 s to ultraviolet epi-illumination, intrinsic vitamin A autofluorescence was completely eliminated and allowed densitometric analysis of the remaining parenchymal NADH autofluorescence by computer-assisted gray-level determination [15, 21].

Density of sinusoids was analyzed by determining the total length of sinusoids per observation area (given in cm/cm<sup>2</sup>), regardless whether they were perfused or not. Diameters of sinusoids (given in micrometers) were measured within 10 individual sinusoids in mid-zonal regions of each observation area (classification according to Rappaport [22]). In addition,  $V_{\text{RBC}}$  was examined in 10 individual sinusoids per observation area using the line-shift method (CapImage). For the assessment of functional vessel surface area, densitometric recording of sinusoidal microvessels was performed in 10 randomly selected lobules per animal with automatic calculation, given in percent of the whole area of the single frame, similarly as previously described by our group [13]. Within these 10 lobules, sinusoidal perfusion was determined by counting the number of perfused sinusoids (given in percent of all sinusoids crossing a 200  $\mu\text{m}$  raster line) [13, 16]. Hepatic perfusion index was assessed by multiplying the density of sinusoids with the sinusoidal perfusion rate (given in % of the hepatic perfusion index of controls set as 100%).

Leukocyte-endothelial cell interaction was analyzed within 10 hepatic lobules and 10 post-sinusoidal venules per animal, including

1) the number of stagnant leukocytes, located within sinusoids (given as cells/mm<sup>2</sup> observation field) and not moving during an observation period of 20 s; and 2) the number of adherent leukocytes, located within post-sinusoidal venules (given as cells/mm<sup>2</sup> endothelial surface, calculated from diameter and length of the surveyed vessel segment, assuming cylindrical geometry), and not moving or detaching from the endothelial lining during an observation period of 20 s [15, 16, 20]. The number of rolling leukocytes within 10 post-sinusoidal venules, moving with less than two-fifths of the centerline velocity, was calculated during an observation period of 20 s, and is given in percent of all passing leukocytes.

Hepatocellular nuclei were identified by their regular, circular shape, and enduring nature of their bisbenzimidazole-related fluorescence. Density of hepatocytes (n/mm<sup>2</sup>), diameter of their nuclei ( $\mu$ m) and the distance between two hepatocellular nuclei ( $\mu$ m) both along and across hepatocellular columns were assessed in 10 randomly selected observation areas.

Apoptotic cell death was analyzed within 10 lobules per animal by counting the number of cells that showed apoptosis-associated condensation, fragmentation, and crescent-shaped formation of chromatin (given as cells/mm<sup>2</sup> observation field) [16, 20, 23].

### Regeneration Study

After intravital fluorescence microscopic analysis animals were sacrificed and the remnant livers were harvested, weighed and processed for immunohistochemistry. The weight of regenerated liver was used to calculate the growth of residual liver lobes as weight of regenerated liver/preoperative liver weight  $\times 100$  (%). Preoperative liver weight was assumed as 4.3% of body weight.

Being aware that liver weights are influenced by various extrinsic and intrinsic factors that are often unrelated to hepatic regeneration, we have additionally assessed protein expression of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) by immunohistochemistry, which has been described as an accurate and reliable marker to quantitatively rate hepatic regeneration [24, 25].

### Histology and Immunohistochemistry

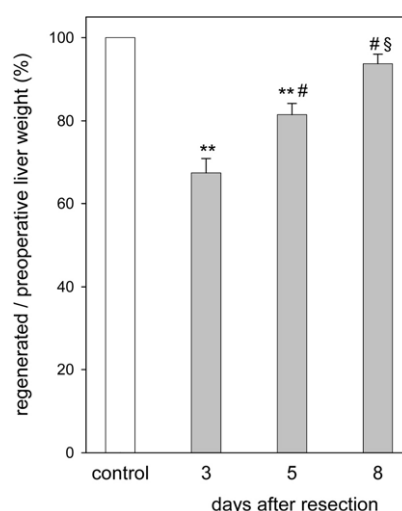
Liver tissue of controls and animals at day 3, 5, and 8 after resection was excised, fixed in 4% phosphate buffered formalin for 2 to 3 days and then embedded in paraffin. From the paraffin-embedded tissue blocks, 5  $\mu$ m sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

For the immunohistochemical demonstration of PCNA, sections collected on poly-L-lysine-coated glass slides were treated with microwaves to unmask the antigen. Rabbit polyclonal anti-PCNA (1:50; Santa Cruz Biotechnology) was used as primary antibody and incubated for 18 h at 4°C. After equilibrating to room temperature, the sections were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:20; Dako Cytomation, Carpinteria, CA) for 30 min. Fuchsin was used as chromogen and the sections were counterstained with hemalaun and afterward examined by light microscopy (Axioskop 40; Zeiss, Göttingen, Germany). PCNA-positive hepatocellular nuclei were counted within 50 consecutive high power fields (HPF) ( $\times 40$  objective, numerical aperture 0.65) and are given as cells/HPF, as recently described by our group [26]. In analogy, PCNA expressing sinusoidal lining cells were assessed and also given as cells/HPF.

To confirm apoptotic cell death, 5  $\mu$ m sections of liver tissue were exposed to an apoptosis-specific staining kit (indirect *in situ* DNA nick end labeling (TUNEL) assay; ApopTag; CHEMICON International, Inc., Temecula, CA) according to the manufacturer's instructions. Quantitative analysis was performed by counting the number of TUNEL positive tissue confined cells within 50 HPF (cells/HPF).

### Statistical Analysis

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. After testing for normality and equal variance across groups, differences between the groups



**FIG. 1.** Ratio of regenerated to preoperative liver weight in normal livers (control) and in livers at 3, 5, and 8 days after hepatectomy. The weight of the regenerating livers was used to calculate the growth of residual liver lobes as ratio of regenerated liver/preoperative liver weight  $\times 100$  (%). Pre-operative liver weight was assumed to be 4.3% of the body weight. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. ANOVA and post hoc comparison; \*\* $P < 0.001$  versus control, # $P < 0.05$  versus day 3, \$ $P < 0.05$  versus day 5.

were assessed by one-way ANOVA, followed by the appropriate post hoc comparison test, including Bonferroni probabilities to compensate for multiple comparisons. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Statistics were performed using the software package Sigma-Stat (Jandel Corp., San Rafael, CA).

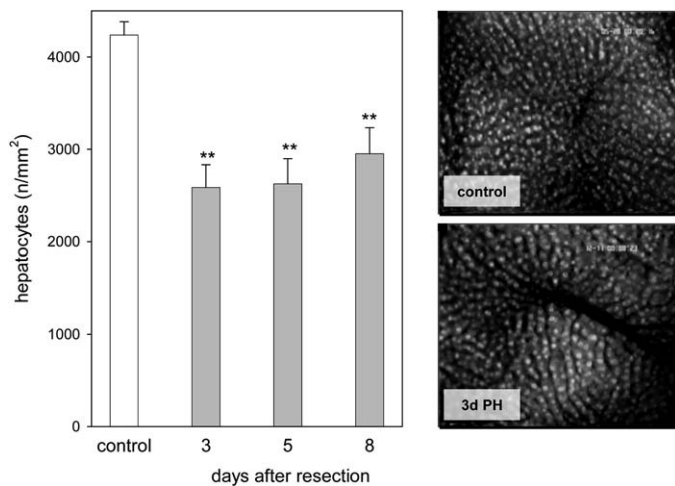
## RESULTS

### Liver Weight

There was a constant increase of liver weight upon hepatectomy with return to almost pre-operative values at day 8 after resection (Fig. 1).

### Hepatic Microarchitecture of Regenerating Livers

Fluorescence microscopic images obtained from control livers were characterized by continuous hepatocellular columns situated along the sinusoidal pathways and adjacent individual Ito cells. At days 3 to 8 after hepatic resection, hepatocellular columns were found shorter and wider, so that the number of hepatocytes per mm<sup>2</sup> area reached significantly lower values of  $2585 \pm 247$ ,  $2625 \pm 273$ , and  $2951 \pm 282$  from day 3 to 8 when compared to controls with  $4238 \pm 144$  cells/mm<sup>2</sup> ( $P < 0.001$ ; Fig. 2). As a consequence of this organ hypertrophy, hepatocytes of regenerating livers presented with a significantly larger nuclear diameter ( $P < 0.001$  versus control; Fig. 3A) and nucleo-nuclear distance along the hepatocellular column (Fig. 3B). Moreover, nucleo-nuclear distance of hepatocytes across the individual columns increased comparably, implying the three-dimensional expansion of the growing organ



**FIG. 2.** Quantitative analysis of hepatocytes (n/mm<sup>2</sup> hepatic surface; left panel) in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. ANOVA and post hoc comparison; \*\* $P < 0.001$  versus control. Representative intravital fluorescence microscopic images (right panel) of bisbenzimid-stained hepatic tissue in a control liver and in a liver at day 3 after resection (3d PH), displaying the reduced density of hepatocytes in regenerating livers. Original magnification  $\times 400$ .

(Table 1). Concomitantly, Ito cells were less numerous than in control livers (Fig. 4) and were found losing vitamin A autofluorescence more rapidly upon epillumination. Homogeneous distribution of Ito cells, as given in control livers, remained preserved during regeneration (Fig. 4).

*In vivo* analysis of bisbenzimid-stained hepatocytes revealed a transiently increased number of apoptotic cells in the regenerating liver when compared with that of control animals (Fig. 5). Analysis of leukocyte interaction with the microvascular endothelium showed

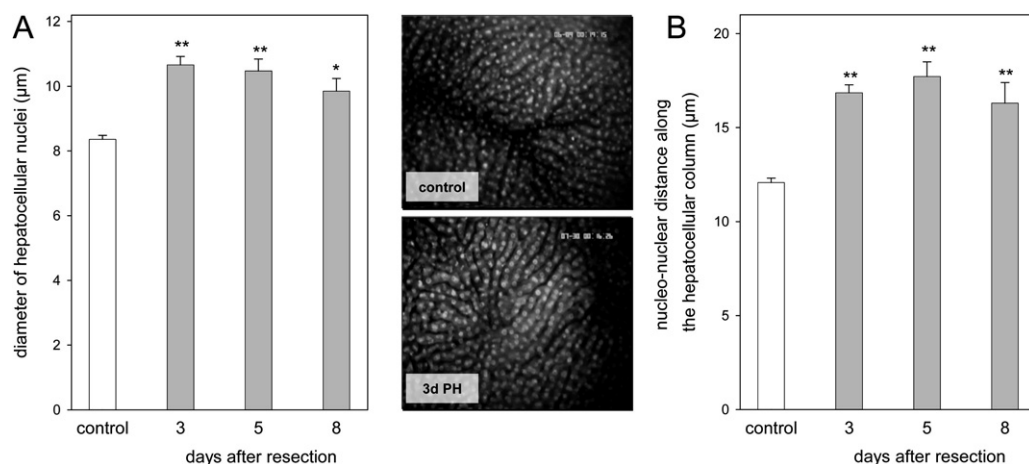
no differences between control livers and regenerating livers with physiological values of leukocyte rolling and adherence (Table 1).

#### Hepatic Microcirculation of Regenerating Livers

Microcirculation in control livers is characterized by a density of 650 cm/cm<sup>2</sup> with about  $\sim 98\%$  of sinusoids forwarding blood (Fig. 6A). At day 3 upon resection sinusoidal density was markedly reduced to 77%, but partially recovered to 87% and 96% of control values at days 5 and 8 (Fig. 6A). During these 8 days upon resection, sinusoidal perfusion rate approached almost 100% (Fig. 6B), thus partly compensating the marked reduction of microvessel density, as given by hepatic perfusion indices of 79, 89, and 98% at days 3, 5, and 8. As sinusoidal microvessels presented with about 10% larger diameters during regeneration (Table 1), overall functional vessel area equaled corresponding values in control livers at all days studied after resection (Table 1). Consequently, liver tissue did not suffer from tissue hypoxia, as given by low NADH fluorescence throughout the observational time course (Table 1). Sinusoidal  $V_{RBC}$  markedly increased with the highest values at day 3 upon hepatectomy, mirroring the hyperperfusion of the reduced liver mass. At day 8 with a nearly complete reconstitution of liver mass, sinusoidal  $V_{RBC}$  almost regained values comparable to those found in control livers (Table 1).

#### Histological and Immunohistochemical Analysis of Regenerating Livers

Indices of hepatocellular regenerative response, i.e., number of PCNA positive hepatocytes, revealed significantly higher values in liver tissue of animals that underwent resection when compared to control ani-



**FIG. 3.** Quantitative analysis of (A) the diameter of hepatocellular nuclei ( $\mu\text{m}$ ) and (B) the nucleo-nuclear distance ( $\mu\text{m}$ ) along individual hepatocellular columns in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. ANOVA and post hoc comparison; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.001$  versus control. Representative intravital fluorescence microscopic images (mid panel) of bisbenzimid-stained hepatic tissue in a control liver and in a liver at day 3 after resection (3d PH), displaying hepatocellular hypertrophy in the regenerating liver. Original magnification  $\times 400$ .



TABLE 1

**Nucleo-Nuclear Distance Across the Hepatocellular Column, Sinusoidal Diameter, Functional Vessel Surface Area, NADH Autofluorescence, Sinusoidal  $V_{RBC}$ , as well as Leukocyte-Endothelial Cell Interaction in Sinusoids and Postsinusoidal Venules in Normal Livers (Control) and in Livers 3, 5, and 8 Days After Hepatectomy**

	Control	Day 3	Day 5	Day 8
		After resection		
Nucleo-nuclear distance across the hepatocellular column ( $\mu\text{m}$ )	$18.2 \pm 0.2$	$22.8 \pm 0.4^*$	$22.3 \pm 0.3^*$	$21.2 \pm 0.4^*$
Sinusoidal diameter ( $\mu\text{m}$ )	$9.0 \pm 0.2$	$10.2 \pm 0.4^*$	$10.2 \pm 0.3^*$	$10.0 \pm 0.4$
Functional vessel surface area (%)	$26.7 \pm 0.5$	$25.5 \pm 2.0$	$26.6 \pm 0.9$	$27.2 \pm 0.9$
NADH autofluorescence (aU)	$74 \pm 13$	$78 \pm 14$	$76 \pm 18$	$64 \pm 9$
Sinusoidal $V_{RBC}$ ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	$187 \pm 32$	$437 \pm 20^*$	$325 \pm 15^*$	$222 \pm 23$
Sinusoidal leukostasis ( $\text{n}/\text{mm}^2$ )	$19 \pm 6$	$17 \pm 5$	$21 \pm 5$	$21 \pm 3$
Venular leukocyte rolling (%)	$58 \pm 10$	$51 \pm 9$	$47 \pm 16$	$62 \pm 13$
Venular leukocyte adherence ( $\text{n}/\text{mm}^2$ )	$92 \pm 30$	$115 \pm 36$	$82 \pm 46$	$54 \pm 30$

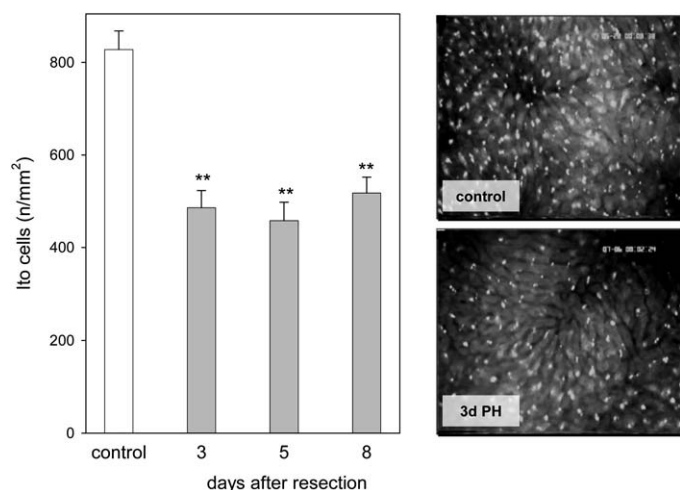
Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM, ANOVA, and post hoc comparison; \*  $P < 0.05$  vs. control.

mals with most distinct differences at day 3 after hepatectomy (Fig. 7A). PCNA positive sinusoidal lining cells were found in the range of one-third to one-tenth of proliferating hepatocytes and peaked at day 5 (Fig. 7B). In line with *in vivo* fluorescence microscopic analysis of hepatocellular apoptosis, the number of TUNEL positive cells was found transiently increased at day 5 after hepatectomy (Fig. 8).

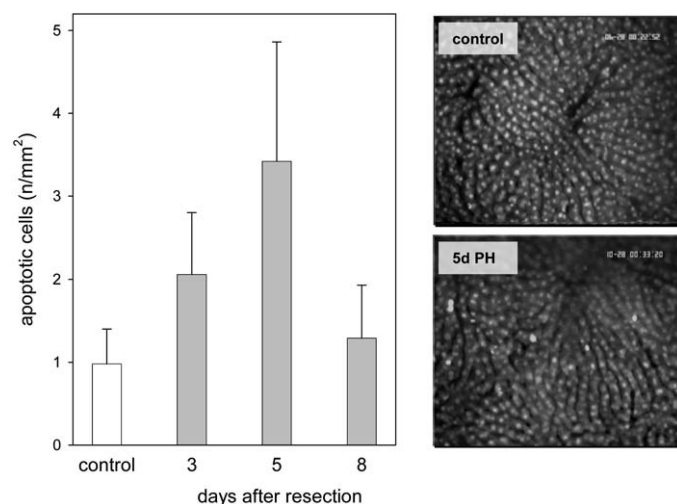
## DISCUSSION

The present study provides quantitative data defining the relationship between hepatic architecture, mi-

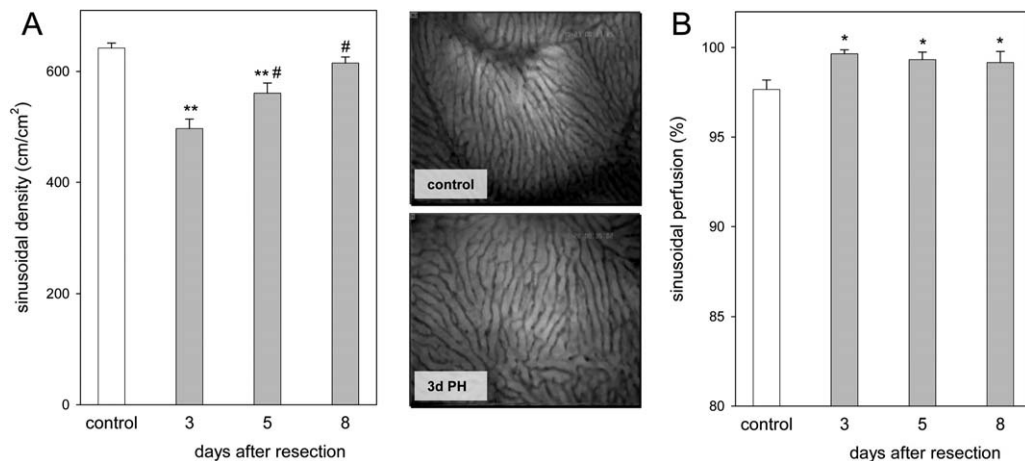
crocirculation and cell integrity during regeneration upon partial hepatectomy. Although it is well known that both hypertrophy, i.e., increase in cell size, and hyperplasia, i.e., increase of cell number, undeniably contribute to the process of liver regeneration [5], we demonstrate herein that within the first days after resection hypertrophy markedly outweighs hyperplasia. Nonetheless, hyperplasia may also have significantly contributed to the early regeneration, as indicated by the significant 11-fold rise of PCNA expression in hepatocytes at day 3 after resection. At day 8, PCNA expression was still slightly elevated and the hepatocytes



**FIG. 4.** Quantitative analysis of Ito cells ( $\text{n}/\text{mm}^2$  hepatic surface; left panel) in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. ANOVA and post hoc comparison; \*\* $P < 0.001$  versus control. Representative intravital fluorescence microscopic images (right panel) of hepatic tissue with vitamin A associated autofluorescent Ito cells in a control liver and in a liver at day 3 after resection (3d PH), displaying the reduced density of Ito cells in the regenerating liver. Original magnification  $\times 400$ .



**FIG. 5.** Quantitative analysis of apoptotic cells ( $\text{n}/\text{mm}^2$  hepatic surface; left panel) in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. Representative intravital fluorescence microscopic images (right panel) of hepatic tissue with bisbenzimid-stained hepatocytes in a control liver and in a liver at day 5 after resection (5d PH), displaying hepatocytes with nuclear chromatin condensation as characteristic sign of cell apoptosis in the regenerating liver. Original magnification  $\times 400$ .

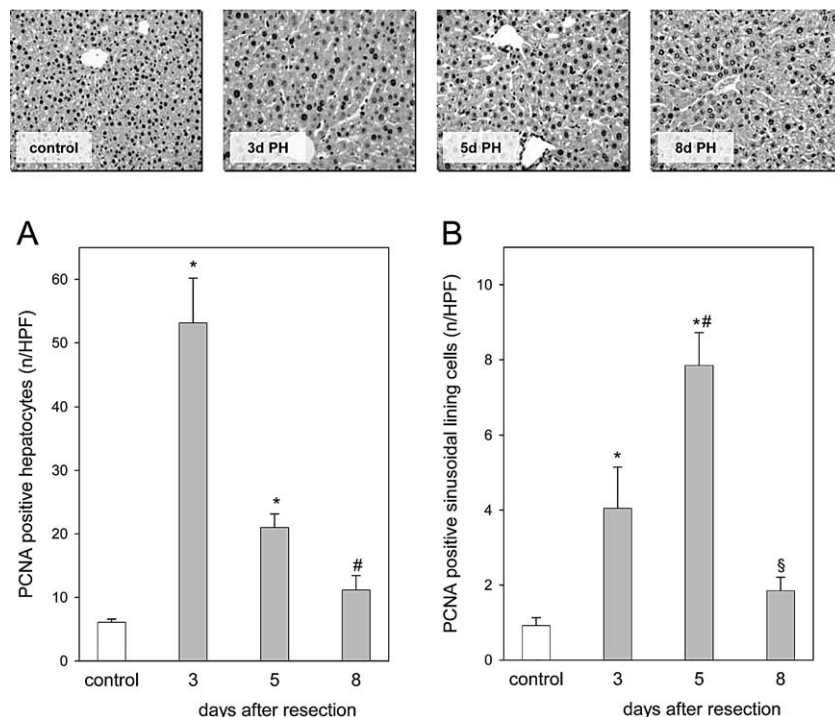


**FIG. 6.** Quantitative analysis of (A) sinusoidal density (cm/cm<sup>2</sup>) and (B) sinusoidal perfusion (%) in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. ANOVA and post hoc comparison; \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.001 *versus* control, # $P$  < 0.05 *versus* day 3. Representative intravital fluorescence microscopic images (mid panel) of hepatic tissue in a control liver and in a liver at day 3 after resection (3d PH), displaying the marked reduction of sinusoidal density in the regenerating liver. Original magnification  $\times$ 400.

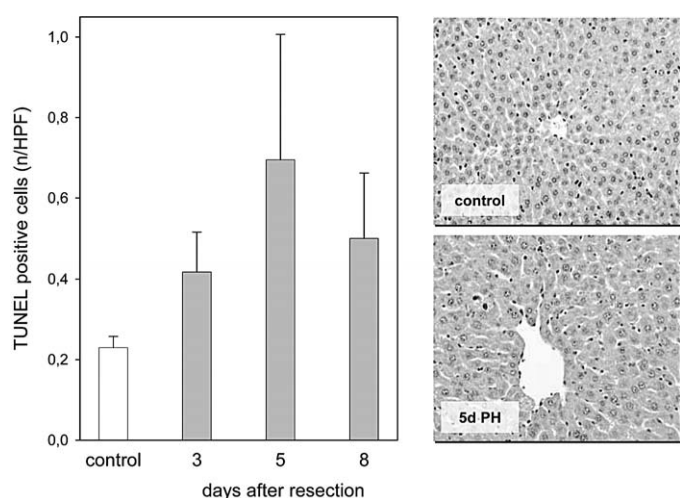
exceeded control dimensions, further underlining hypertrophy and hyperplasia as parallel events of the compensatory growth of liver tissue. PCNA expression of sinusoidal lining cells reached the maximum level at day 5 after resection, as non-parenchymal liver cells are

well known to enter into DNA synthesis about 24 h after the hepatocytes, with a peak of DNA synthesis at 48 h or later [1].

As a consequence of hepatocellular hypertrophy, the density of vitamin A associated autofluorescent sites,



**FIG. 7.** Quantitative analysis of PCNA immunohistochemistry, i.e., (A) PCNA positive hepatocytes and (B) PCNA positive sinusoidal lining cells (each given as cells/HPF) in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. ANOVA and post hoc comparison; \* $P$  < 0.05 *versus* control, # $P$  < 0.05 *versus* day 3, \$ $P$  < 0.05 *versus* day 5. Representative immunohistochemical images (upper panel) of hepatic tissue in a control liver as well as in livers at 3, 5, and 8 days after resection, displaying the marked rise of PCNA positive cells as characteristic sign of both parenchymal and non-parenchymal cell proliferation in the regenerating liver. Original magnification  $\times$ 400.



**FIG. 8.** Quantitative analysis of TUNEL histochemistry (TUNEL positive cells/HPF; left panel) in normal livers (control) and in livers 3, 5, and 8 days after hepatectomy. Values of six animals per group and time point are given in means  $\pm$  SEM. Representative histochemical images (right panel) of hepatic tissue in a control liver and in a liver at day 3 after resection (3d PH), displaying the increase of TUNEL positive cells as characteristic sign of liver cell apoptosis in the regenerating liver. Original magnification  $\times 400$ .

namely Ito cells, decreased without losing their homogeneous distribution within the liver tissue, as assessed by *in vivo* fluorescence microscopy. Mabuchi and co-workers, using the identical technique in rats, reported about a regular arrangement of Ito cells around sinusoids and unchanged numbers of them per sinusoid at day 3 after hepatectomy [27]. In contrast, we could not confirm the rise in Ito cell-to-hepatocyte ratio, as we preferred to assess both parenchymal and non-parenchymal cells with respect to their number per area. In case of proliferation-associated hepatocyte enlargement, neighboring Ito cells disperse from each other with the result of a decrease in cell density. Thus, observation that the distances between the Ito cells approached half of those found in control livers [27] is in clear contrast to the present results and cannot be explained, unless if rat *versus* mouse species differences account for this discrepancy.

Interestingly, enlargement of hepatocytes during liver regeneration has been shown to be mainly because of portal hyperdynamic state, as in hepatectomized rats with a portohepatic shunt hepatocytes did show similar DNA synthesis, but were not enlarged [28]. The hyperdynamic state, which is nicely mirrored by the transient rise of sinusoidal  $V_{RBC}$  upon 70% reduction of liver mass, was further necessary for liver regeneration by activating hepatocyte growth factor, and thus not only promoting hepatocyte hypertrophy but also avoiding hepatocyte apoptosis [28]. In line with this, only minimal apoptosis was noted throughout the course of the present study. Although always ranging below 3 to 5 apoptotic cells per  $mm^2$  hepatic surface

area, a kinetic was present in the apoptotic cell rate within the 8 days of observation upon liver resection. A slight increase in the apoptotic cell rate was observed at a time when the number of PCNA-expressing cells already decreased. This may be interpreted as a repair mechanism and a response to the generation of superfluous hepatocytes [29]. Elimination of cells via apoptosis is a common event in processes involving organ growth [30] and reflects the fine control of liver mass recovery upon resection [2].

Notably, though being associated with a surge of mediators, liver regeneration lacked characteristic signs of inflammation, such as increased leukocytic activation and interaction with the microvascular endothelium, further underlining the genuine property of the liver to proliferate upon mass reduction [31].

Numerous transcription factors, cell cycle genes and growth factors have been shown to be involved in the concerted action of self-limiting hepatocyte proliferation which never exceeds its predicted end point. Within this scenario, Kupffer cells play an important role as the major source of mediators that both initiate and terminate regeneration [1]. Although liver weights regained almost normalcy at 8 days after resection, similarly as described by others [32], the organ remodeling process was not found terminated with respect to hepatic morphology and microcirculation, still substantially differing from control. It is reported that when hepatocytes stop their DNA synthesis, up-regulation of interstitial procollagen transcripts can be observed [33]. This indicates that during early regeneration the amount of extracellular matrix (ECM) is reduced as a consequence of hepatocyte proliferation without concomitant ECM synthesis.

Liver regeneration is considered as an angiogenesis-associated phenomenon, as pro-angiogenic agents have been shown to accelerate hepatic mass reconstitution, while anti-angiogenic treatments decreased and delayed hepatocellular DNA synthesis with the consequence of growth retardation of the original liver mass [9, 32]. Physiological liver regeneration, as herein assessed using *in vivo* microscopy, presents a marked reduction in the density of hepatic sinusoidal microvessels that, however, were characterized by a concomitant rise in diameter. As a consequence, functional vessel area was shown to be slightly lower only at day 3, while later hepatectomized animals did not differ from control animals with respect to functional vessel area. At first sight, this finding conflicts to what is known by studies demonstrating increased microvessel density by using CD31 immunohistochemical staining of endothelial cells [32]. However, one has to keep in mind that endothelial cell proliferation goes along with an increase of CD31 staining, but still precedes vessel tube formation. Thus, the discrepancies



can simply be explained by the fact that immunohistochemistry only determines the density of structures containing endothelial cells, while *in vivo* microscopy is capable of quantifying functional microvessel density.

Interestingly, functional vessel surface area did not change significantly over the entire observation period of regeneration. This is in line with the results of a previous study [34], and can be attributed to the dilation of the individual sinusoids. Most importantly, this may have guaranteed an adequate oxygen supply to tissue during regeneration, as indicated by comparably low NADH autofluorescence levels of parenchymal tissue in all groups. Thus, upon liver resection, i.e., under the condition of reduced liver mass, functional vessel area seems to efficiently preserve metabolic function and oxygenation of the organ.

In summary, we present comprehensive data on hepatic architecture, microcirculation and cell integrity during liver regeneration after resection. The knowledge derived from this data may now be applied to develop strategies in the fight against impeded liver growth.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors kindly thank Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz, Maren Nerowski, and Claudia Vergien (Department of Experimental Surgery, University of Rostock) for their excellent technical assistance and Evelyn Kidess (Department of Experimental Surgery, University of Rostock) for her expert assistance in editing the manuscript.

#### REFERENCES

1. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60.
2. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19.
3. Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W, Michalopoulos GK. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004;39:1056.
4. Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001;33:1377.
5. Rozga, J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit* 2002;8:RA32.
6. Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;17:11181.
7. Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005;93:101.
8. Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001;34:1135.
9. Greene AK, Wiener S, Puder M, et al. Endothelial-directed hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Ann Surg* 2003;237:530.
10. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962;22:842.
11. Ogawa K, Medline A, Farber E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: The comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Br J Cancer* 1979;40:782.
12. Sugiyama Y, Ohta H. Changes in density and distribution of gap junctions after partial hepatectomy: Immunohistochemical and morphometric studies. *Arch Histol Cytol* 1990;53:71.
13. Vollmar B, Siegmund S, Menger MD. An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular rearrangements in developing cirrhosis in rats. *Hepatology* 1998;27:1544.
14. Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: Technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003;16:99.
15. Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD. High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for *in vivo* monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res* 1997;54:164.
16. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G769.
17. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 2005;241:477.
18. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994;145:1421.
19. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1994;267:G786.
20. Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J* 2003;17:660.
21. Suematsu M, Oda M, Suzuki H, et al. Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc Res* 1993;46:28.
22. Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 1973;6:212.
23. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 2000;7:291.
24. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 1997;26:945.
25. Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 1998;131:251.
26. Eipel C, Schuett H, Glawe C, Bordel R, Menger MD, Vollmar B. Pifithrin-alpha induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2005;43:829.
27. Mabuchi A, Mullaney I, Sheard PW, et al. Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2004;40:910.



28. Marubashi S, Sakon M, Nagano H, et al. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery* 2004;136:1028.
29. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403.
30. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 2000;10:161.
31. Alison MR, Poulsom R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001;21:367.
32. Drixler TA, Vogten MJ, Ritchie ED, et al. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* 2002;236:703.
33. Rudolph KL, Trautwein C, Kubicka S, et al. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1999;30:1159.
34. Vogten JM, Smakman N, Voest EE, Borel Rinkes ICH. Intravital analysis of microcirculation in the regenerating mouse liver. *J Surg Res* 2003;113:264.

## **ANHANG 2**

## Loss of NF- $\kappa$ B activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy

Kerstin Abshagen,<sup>1</sup> Christian Eipel,<sup>1</sup> Jörg C. Kalff,<sup>2</sup> Michael D. Menger,<sup>3</sup> and Brigitte Vollmar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Experimental Surgery, University of Rostock, Rostock; <sup>2</sup>Department of Surgery, University of Bonn, Bonn; and <sup>3</sup>Institute for Clinical and Experimental Surgery, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

Submitted 27 August 2006; accepted in final form 20 February 2007

**Abshagen K, Eipel C, Kalff JC, Menger MD, Vollmar B.** Loss of NF- $\kappa$ B activation in Kupffer cell-depleted mice impairs liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1570–G1577, 2007. First published February 22, 2007; doi:10.1152/ajpgi.00399.2006.—Kupffer cells (KCs) are located in the liver sinusoids adjacent to hepatocytes and are capable of producing important growth-regulating mediators that exert both stimulatory and inhibitory influences on hepatocyte proliferation by paracrine mechanisms. To elucidate the overall effect of KC depletion on liver regeneration, mice were selectively and long-standing depleted of KCs by liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. Using *in vivo* fluorescence microscopy, immunohistochemistry, Western blot analysis, and NF- $\kappa$ B transcription factor DNA binding activity and cytokine assays, we analyzed livers of KC-depleted and KC-competent mice at days 3, 5, and 8 after partial (i.e., 68%) hepatectomy (PH). Selective KC elimination delayed cell proliferation, as indicated by significantly reduced PCNA and cyclin B1 protein expression in liver tissue at day 3 after PH. This was associated with a lower liver weight at day 8 upon PH. Resection-associated activation of NF- $\kappa$ B with translocation into parenchymal and non-parenchymal cell nuclei was diminished in livers of KC-depleted mice, primarily at day 3 after PH. KC-depleted mice further lacked the resection-induced rise in TNF- $\alpha$  and IL-6 serum concentrations. These findings imply that KCs play a stimulatory role in liver regeneration, mainly by activating NF- $\kappa$ B with influence on the cell cycle and by enhancing expression of the proliferative cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6.

*in vivo* fluorescence microscopy; hepatocytes; clodronate; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-6; proliferating cell nuclear antigen; nuclear factor- $\kappa$ B

LIVER REGENERATION IS A COMPLEX and evolutionarily conserved process that involves paracrine interactions of numerous hepatic cell types. Kupffer cells (KCs) are the liver macrophages predominantly located in the lumen of hepatic sinusoids, where they mainly clear particulate and foreign materials from the portal circulation (28). Because KCs are known to produce a variety of growth- and immunomodulating mediators that have stimulatory and inhibitory effects on liver regeneration, they have been postulated to play a key role in liver regeneration (35). However, their function in liver regeneration after partial hepatectomy (PH) and the underlying mechanisms are not fully understood (12).

Macrophage depletion constitutes a widely accepted and useful approach to elucidate their functional aspects *in vivo*. Liver tissue macrophages can selectively be depleted by intravenous administration of liposome-encapsulated dichlorometh-

ylene diphosphonate (Cl<sub>2</sub>MDP) without activation or damage to other liver cells (36, 37). So far, there are only a limited number of studies available using this KC-depleting approach to clarify their role in liver regeneration (7, 26, 35). Although Boulton et al. (7) noted an augmentation of the early phase of liver regeneration following KC depletion, it has also been reported that KC depletion exerts an inhibitory effect on liver regeneration by alteration of hepatic cytokine expression (26, 35). Most recently, KCs have been shown to express NF- $\kappa$ B (30, 42), which in turn is advocated to be a critical effector of the cascade initiating the regenerative process (23). Experiments in hepatectomized animals have shown that inhibition of NF- $\kappa$ B results in massive hepatocyte apoptosis and decreased mitosis with impairment of liver function (19). The so-far contradictory data on KCs in liver regeneration prompted us to precisely study the process of liver regeneration in KC-depleted animals with the emphasis on NF- $\kappa$ B activation and its downstream signaling.

### MATERIALS AND METHODS

**Liposome preparation and administration.** Cl<sub>2</sub>MDP was kindly provided as gift from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Cl<sub>2</sub>MDP encapsulated in multilamellar liposomes (400 nm) was prepared using the method described by van Rooijen and Sanders (36) with minor modifications. Inactive PBS-containing liposomes were prepared under identical conditions at the same time. All liposome preparations were stored under nitrogen gas and used within 14 days.

**Experimental groups and protocol.** For depletion of KCs, mice were applied Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes (0.1 ml/10 g body wt) via the tail vein under light ether anesthesia at 24 h before PH and at every 72 h after PH. Control animals received equivalent volumes of PBS-liposomes (0.1 ml/10 g body wt). In KC-depleted and KC-competent mice (controls), livers were analyzed at days 3, 5, and 8 after PH ( $n = 6$  animals per group and time point) as well as in nonresected animals (day 0;  $n = 6$  animals per group and time point).

**Liver regeneration model.** Upon approval by the local government, all experiments were performed in accordance with the German legislation on protection of animals and the National Institutes of Health "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" [DHEW Publication No. (NIH) 86-23, Revised 1985]. Female C57BL/6J mice (10–12 wk old; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were anesthetized by breathing isoflurane (1.5 vol%) and subjected to a 68% PH (13, 17). The animals were allowed to recover from anesthesia and surgery under a red warming lamp and were held in single cages until the subsequent experiments followed at postoperative days 3, 5, and 8 ( $n = 6$  animals per time point). Sham-operated animals without hepatic resection served as group day 0.

Address for reprint requests and other correspondence: B. Vollmar, Institute for Experimental Surgery, Univ. of Rostock, 18055 Rostock, Germany (e-mail: brigitte.vollmar@med.uni-rostock.de).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**In vivo fluorescence microscopy for analysis of KC phagocytic activity.** Under ketamine-xylazine anesthesia (90:25 mg/kg body wt ip), sham-treated controls and hepatectomized animals were subjected to intravital fluorescence microscopy, as previously described in detail by our group (1). Animals were placed in supine position on a heating pad and underwent insertion of a polyethylene catheter (PE-50, inner diameter 0.58 mm; Portex, Hythe, UK) in the right carotid artery. After laparotomy and exteriorization of the left liver lobe, KC phagocytic activity was assessed by intra-arterial injection of plain fluorescent latex particles ( $3 \times 10^6$  beads/10 g body wt in isotonic saline; diameter 1.1  $\mu$ m; Polysciences, Warrington, PA) (38). For assessment of kinetics of particle adherence, 20–25 selected observation areas per experiment were videotaped successively within 10 min after injection with the use of blue light epi-illumination (excitation/emission wavelength 450–490 nm/>520 nm) and a water-immersion objective ( $\times 20/0.50$ W; Zeiss). The kinetics of adherence were quantified off-line by counting the number of particles moving in sinusoids as a percentage of all particles visible in the area during observation for 10 s (38). After the microscopy, liver tissue was sampled for subsequent histochemical and molecular biology analysis ( $n = 6$  animals per time point and group).

**Regeneration study.** Following in vivo microscopy, animals were killed and the remnant livers were harvested, weighed, and processed for subsequent analysis. The weight of regenerated liver was used to calculate the growth of residual liver lobes according to weight of regenerated liver/preoperative liver weight  $\times 100$  (%). Preoperative liver weight was assumed to be 4.3% of body weight.

Being aware that liver weight is influenced by various extrinsic and intrinsic factors that are often unrelated to hepatic regeneration, we additionally used 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation to study DNA synthesis upon liver resection by immunohistochemistry. For this purpose, additionally pretreated mice were given BrdU (50 mg/kg body wt ip) 1 h before harvest of liver tissue ( $n = 4$  animals per group and time point) (4, 5, 13).

**Western blot analysis of liver tissue.** For Western blot analysis of PCNA, cyclin B1, and NF- $\kappa$ B, liver tissue was homogenized in lysis buffer (1 M Tris, pH 7.5, 5 M NaCl, 250 mM EDTA, 10% Triton-X 100, 4%  $\text{NaN}_3$ , and 100 mM PMSF), incubated for 30 min on ice, and centrifuged for 15 min at 10,000  $g$ . Before use, all buffers received a protease inhibitor cocktail (1:100 vol/vol; Sigma, St. Louis, MO). Protein concentrations were determined using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL) with bovine serum albumin as standard. Equal amounts of whole protein extracts (PCNA: 20  $\mu$ g; cyclin B1 and NF- $\kappa$ Bp65: 60  $\mu$ g) were separated discontinuously on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (12% SDS-PAGE) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P transfer membrane; Millipore, Billerica, MA). After blockade of nonspecific binding sites, membranes were incubated for 2 h at room temperature with monoclonal rabbit anti-PCNA (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), polyclonal rabbit anti-cyclin B1 (1:1,000; Santa Cruz), and polyclonal goat anti-NF- $\kappa$ Bp65 (1:500; Santa Cruz) followed by peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (PCNA: 1:8,000; cyclin B1: 1:10,000; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany) or rabbit anti-goat IgG antibody (NF- $\kappa$ Bp65: 1:40,000; Santa Cruz) as secondary antibodies. Protein expression was visualized by means of luminol-enhanced chemiluminescence (ECL Plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and exposure of the membrane to a blue light-sensitive autoradiography film (Kodak BioMax light film; Kodak-Industrie, Chalon-sur-Saone, France). Signals were densitometrically assessed (Quantity One, Gel Doc XR; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) and normalized to the  $\beta$ -actin signals (monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin antibody, 1:20,000; Sigma) or  $\beta$ -tubulin signals (polyclonal rabbit anti- $\beta$ -tubulin antibody, 1:500; Santa Cruz).

**Immunohistochemistry.** Liver tissue of animals at days 0, 3, 5, and 8 after resection was excised, fixed in 4% phosphate-buffered formalin for 2–3 days, and then embedded in paraffin. From the paraffin-embedded tissue block, 5- $\mu$ m sections were cut.

The degree of KC depletion was analyzed immunohistochemically by using the F4/80 antigen (1:10; Serotec, Oxford, UK), a marker for resident tissue macrophages (35). Overnight incubation (4°C) with the first antibody (polyclonal rat anti-F4/80) was followed by alkaline-phosphatase (AP)-conjugated mouse anti-rat immunoglobulin (1:200; Santa Cruz). The sites of AP binding were detected using fuchsin (Dako Cytomation, Hamburg, Germany).

For the demonstration of DNA-incorporated BrdU in liver cells, sections collected on poly-L-lysine-coated glass slides were incubated with monoclonal mouse anti-BrdU antibody (1:50; Dako) overnight at 4°C, followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (LSAB kit plus; Dako). The sections were counterstained with hemalaun. The sites of peroxidase binding were detected using 3,3'-diaminobenzidine. BrdU-positive hepatocellular nuclei were counted within 50 consecutive high-power fields (HPF;  $\times 40$  objective, numerical aperture 0.65), and counts are given as cells per HPF (13). In analogy, BrdU-expressing nonparenchymal cells were assessed, and counts are also given as cells per HPF.

The detection of active NF- $\kappa$ B was performed using a polyclonal goat antibody directed against the epitope mapping within the amino-terminal domain of NF- $\kappa$ Bp65 (1:100; Santa Cruz) overnight at 4°C, followed by HRP-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin (LSAB kit plus). Cell-specific expression of NF- $\kappa$ Bp65 was analyzed by counting NF- $\kappa$ Bp65-positive hepatocytes and nonparenchymal cells within 50 HPF with discrimination of the intracellular distribution serving as an indicator of NF- $\kappa$ B nuclear translocation. The nuclear-to-cytoplasmic ratio of parenchymal and nonparenchymal cells was calculated by dividing the number of cells with nuclear NF- $\kappa$ Bp65 positivity by the number of cytoplasmic NF- $\kappa$ Bp65 positive cells.

**Bioplex protein array system.** A panel of serum cytokines was measured in duplicate using the Bioplex protein array system (Bio-Rad), according to the instructions of the manufacturer. This novel multiplexed, particle-based flow cytometric assay, which utilizes anti-cytokine monoclonal antibodies linked to microspheres incorporating distinct proportions of two fluorescent dyes, enables quantification of several mediators in a sample volume as small as 12.5  $\mu$ l. With the Bioplex cytokine assay kit in combination with the Bioplex Manager software, serum TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 levels were assessed. For each cytokine, standards ranged from 1.5 to 32,000 pg/ml serum. Values of the respective serum cytokine levels of mice at day 0 were set as 1, and all other data are given as relative increases.

**NF- $\kappa$ B transcription factor assay.** DNA-binding activity of hepatic NF- $\kappa$ Bp65 was measured in duplicate using a nonradioactive transcription factor assay (Chemicon International, Temecula, CA) according to the instructions of the manufacturer. This method combines the principle of the electrophoretic mobility shift assay with the 96-well-based enzyme-linked immunosorbent assay. During the assay, a double-stranded biotinylated oligonucleotide containing the flanked DNA binding consensus sequence for NF- $\kappa$ B (5'-GG-GACTTTCC-3') was mixed with nuclear extract of liver tissue (50  $\mu$ g/well) and transferred to the streptavidin-coated plate well. The bound NF- $\kappa$ B transcription factor subunit p65 was detected with a specific primary antibody, followed by a highly sensitive HRP-conjugated secondary antibody, for which colorimetric signals were detected in a spectrophotometric plate reader (Magellan; Tecan Sunrise, Tecan Trading, Männedorf, Switzerland).

**Statistical analysis.** All data are expressed as means  $\pm$  SE. After testing for normality and equal variance across groups, we assessed differences between the groups using one-way ANOVA followed by the appropriate post hoc comparison test, including Bonferroni probabilities to compensate for multiple comparisons. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Statistics were performed using the software package SigmaStat (Jandel, San Rafael, CA).



## RESULTS

**Evidence of KC depletion.** In all experiments we verified the completeness of KC depletion by immunostaining for the F4/80 antigen. Treatment with Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes at -24 h and subsequently every 72 h guaranteed absence of KCs at the time point of resection as well as during the whole 8-day period of regeneration (Fig. 1, A and B). There was no histological evidence of damage to hepatocytes or other cell subpopulations (Fig. 1, A and B).

Uptake of fluorescent latex particles was used as a functional parameter of KC phagocytosis. Following Cl<sub>2</sub>MDP-liposome treatment, there was a distinct attenuation in clearance of latex particles from blood; however, this was without complete blockade of particle adherence (Fig. 1C).

**Effect of KC depletion on liver regeneration.** There was a constant increase of liver weight upon PH with return to almost preoperative values at day 8 after resection in KC-competent mice, whereas KC-depleted animals showed only a limited restoration, up to 79% of the initial weight (Table 1).

**Effect of KC depletion on proliferation markers in liver regeneration.** The cumulative hepatocyte DNA synthesis, as histochemically determined in liver sections by BrdU incorporation, was slightly decreased at day 3 after PH in KC-depleted mice compared with control mice, with a displacement of the proliferation maximum of parenchymal cells from day 3 in KC-competent mice to day 5 in KC-depleted mice (Fig. 2, A and B). In contrast, the DNA synthesis phase of nonparenchymal cells was not found altered in KC-depleted animals; however, a second proliferation peak was observed at day 8 after resection (Fig. 2, C and D).

To exclude the possibility that the proliferating nonparenchymal cells are KCs, we performed double immunostaining for BrdU and F4/80. The immunohistochemical images of KC-depleted animals did not show cells double positive for F4/80 and BrdU, confirming that hepatectomy of these animals

Table 1. Liver weight at days 0, 3, 5, and 8 after PH in mice treated with either PBS-liposomes or Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes

	Liver Weight, %			
	Day 0	Day 3	Day 5	Day 8
PBS	100.0±0.0	70.0±2.4	85.0±3.3	91.1±2.5
Cl <sub>2</sub> MDP	100.0±0.0	72.1±4.2	79.2±3.8	79.4±4.3*

Values are given as means ± SE of 6 animals per group and time point. \**P* < 0.05 vs. PBS; ANOVA and post hoc comparison.

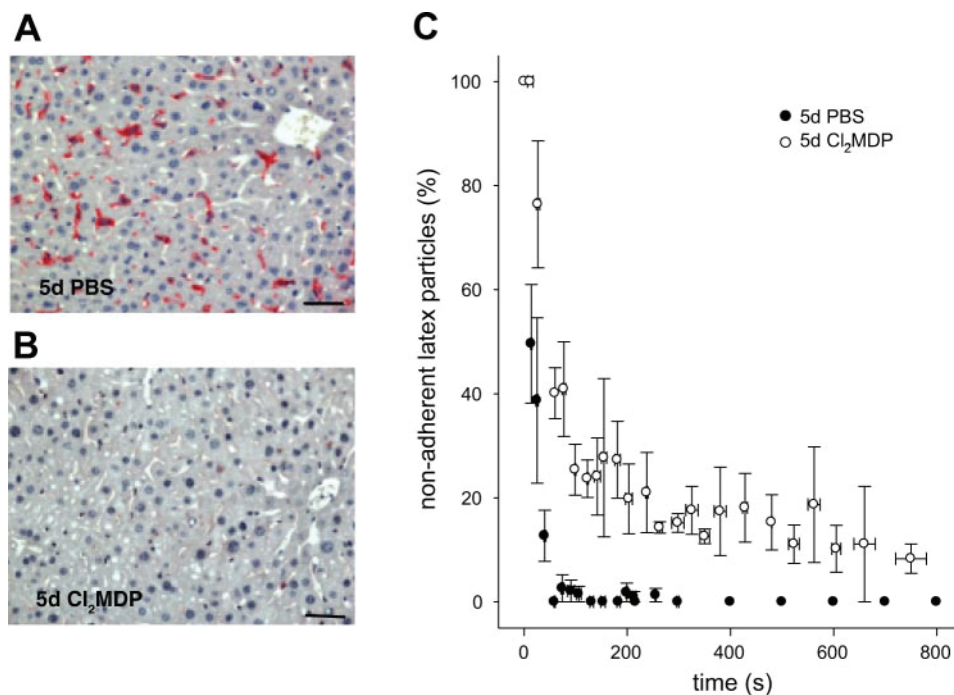
did not induce KC repopulation and proliferation (data not shown). This indicates that BrdU-positive nonparenchymal cells in KC-depleted livers can most probably be attributed to proliferation of sinusoidal endothelial cells and stellate cells.

Densitometric analysis of PCNA protein expression served as a parameter for proliferation and showed a significant reduction in KC-depleted mice. In particular, at days 3 and 5 after resection, hepatic PCNA expression in KC-depleted mice was <50% of that found in KC-competent control mice (Fig. 3, A and B).

Densitometric analysis of cyclin B1 protein expression, an M-phase-specific protein of the cell cycle (40, 43), served to distinguish the mitotic rate in KC-competent and KC-depleted livers. Cyclin B1 revealed an expression pattern comparable to that of PCNA, characterized by significantly reduced values in KC-depleted mice at day 3 after PH (Fig. 3, C and D).

**Effect of KC depletion on transcriptional factor NF-κB during liver regeneration.** Because of the lack of KC-specific NF-κBp65 expression, densitometric analysis of total NF-κBp65 levels in whole liver protein extracts showed a marked decrease at day 3 after resection in KC-depleted mice (Fig. 4, A and B). Furthermore, DNA-binding activity of NF-κBp65 in hepatic nuclear extracts was significantly reduced to 25% at

Fig. 1. Representative images of hepatic tissue for F4/80 antigen immunostaining at day 5 after partial hepatectomy (PH) of a control (A) and a Kupffer cell (KC)-depleted animal (B). Whereas KCs are easily identified in control sections, KCs are missing upon treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate (Cl<sub>2</sub>MDP-liposome). Scale bars represent 50 μm. Latex particle adherence (C), assessed using intravital fluorescence microscopy as the fraction of nonadherent particles, at day 5 (5d) after PH in KC-competent (PBS) and KC-depleted animals (Cl<sub>2</sub>MDP). Values are means ± SE of 6 independent experiments per group. Note the marked delay and reduction of latex particle adherence in the KC-depleted animal, confirming the absence of KC-confined phagocytic activity.



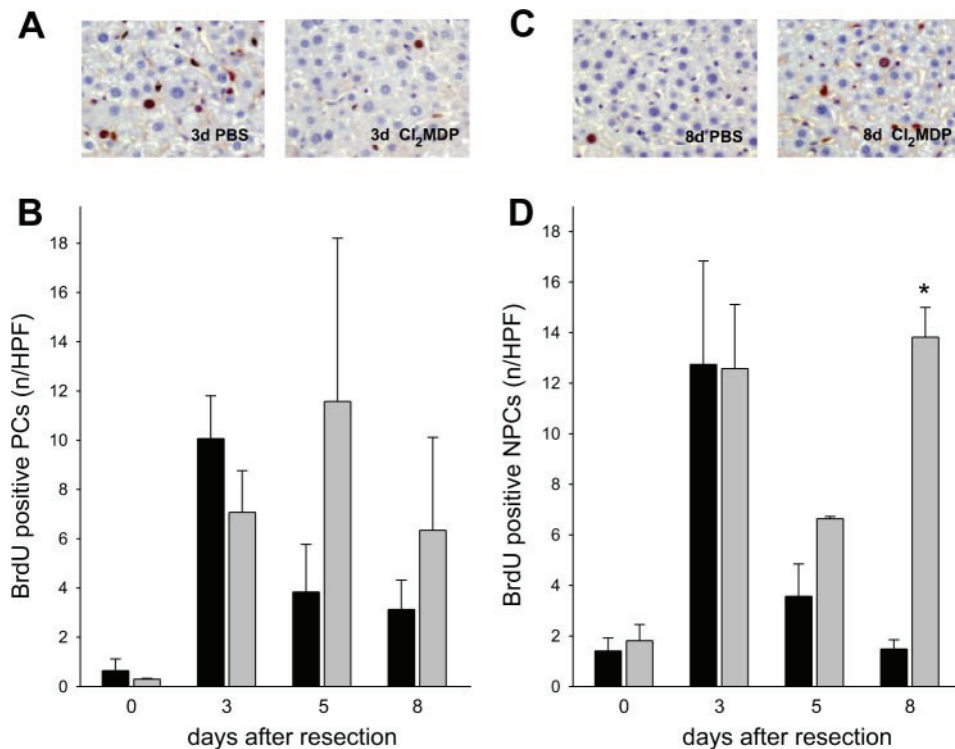


Fig. 2. Representative immunohistochemical images (A and C; original magnification,  $\times 400$ ) and quantitative analysis (B and D) of BrdU-stained parenchymal (PCs) and non-parenchymal cells (NPCs) in tissue sections at multiple time points (3d, day 3; 8d, day 8) upon PH in controls (solid bars) and KC-depleted mice (shaded bars). Values are means  $\pm$  SE of 4 independent experiments per group and time point and are expressed as the number of cells per high-power field (n/HPF). ANOVA and post hoc comparison; \* $P < 0.05$  vs. PBS.

this early time point after resection compared with extracts of KC-competent mice (Fig. 4C).

Following immunohistochemistry with subsequent quantitative analysis of the intracellular distribution of NF- $\kappa$ Bp65, sham-treated nonresected animals showed little NF- $\kappa$ Bp65 staining in the cytoplasmic and, particularly, the nuclear compartment of liver cells (Fig. 5, B and D). On the contrary,

NF- $\kappa$ Bp65 expression was significantly enhanced upon resection with a preferential location in nuclei of hepatocytes at day 3 and of nonparenchymal cells, namely, KCs, at days 3 and 5 (Fig. 5, A–D). Cl<sub>2</sub>MDP-liposome application strikingly attenuated this increase of NF- $\kappa$ Bp65 expression in hepatocytes and nonparenchymal cells (Fig. 5, A–D). In these animals, NF- $\kappa$ Bp65 staining revealed a perinuclear pattern and was rarely

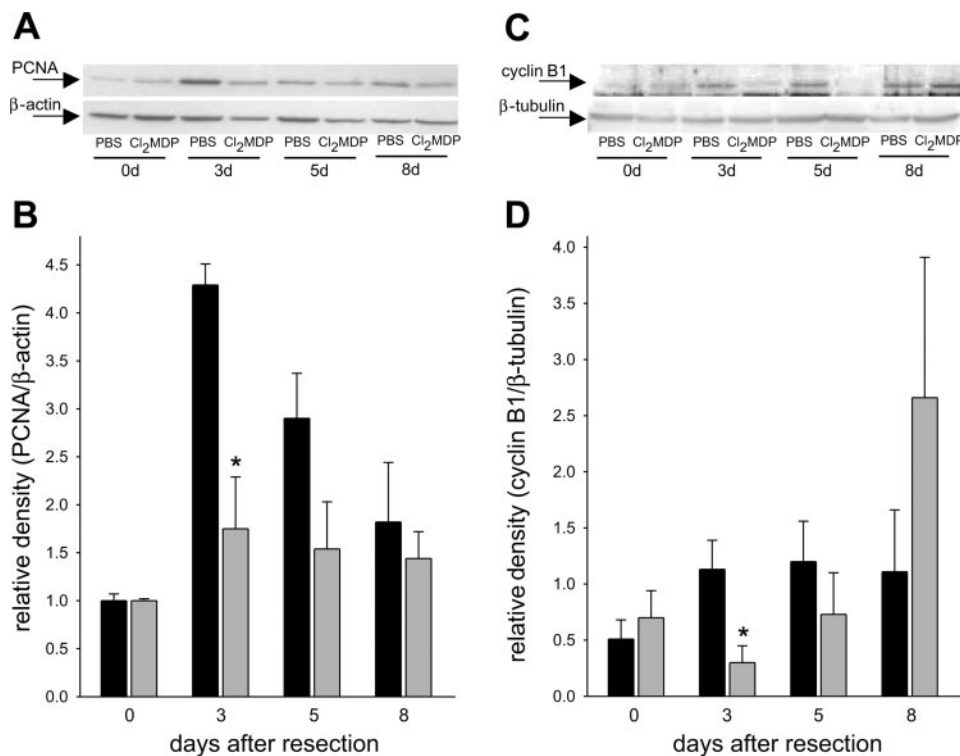


Fig. 3. Representative Western blot analysis (A and C) and densitometric analysis (B and D) of PCNA (A and B) and cyclin B1 expression (C and D) in liver tissue at multiple time points upon PH in controls (solid bars) and KC-depleted mice (shaded bars). Western blot signals were corrected with those of  $\beta$ -actin (B) and  $\beta$ -tubulin (D) serving as internal control. Values are means  $\pm$  SE of 6 independent experiments per group and time point. ANOVA and post hoc comparison; \* $P < 0.05$  vs. PBS.

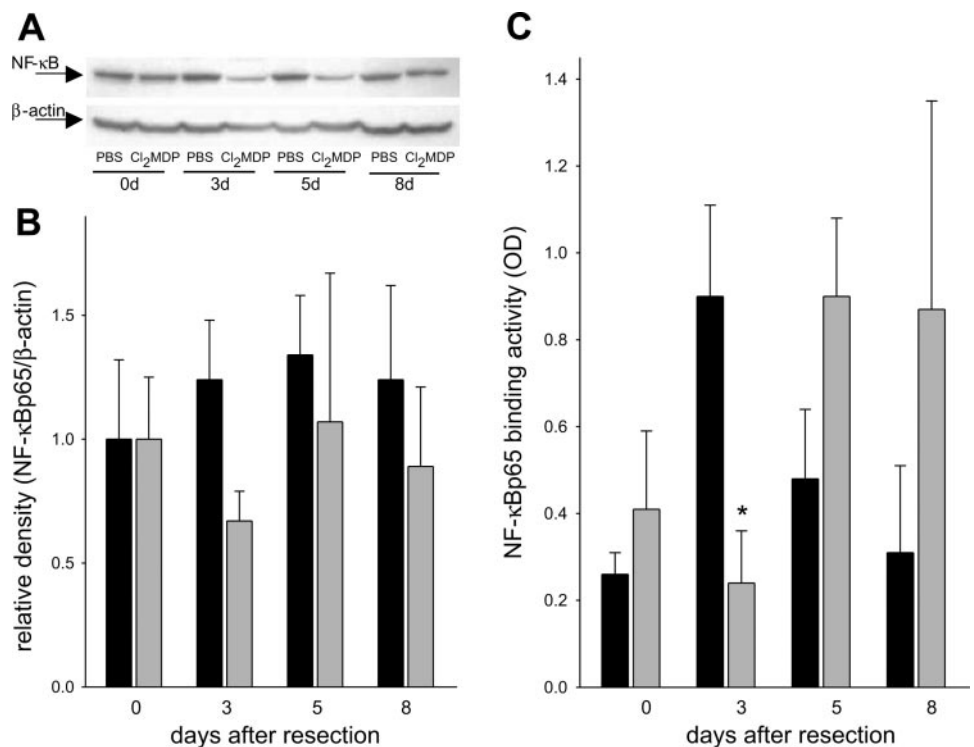


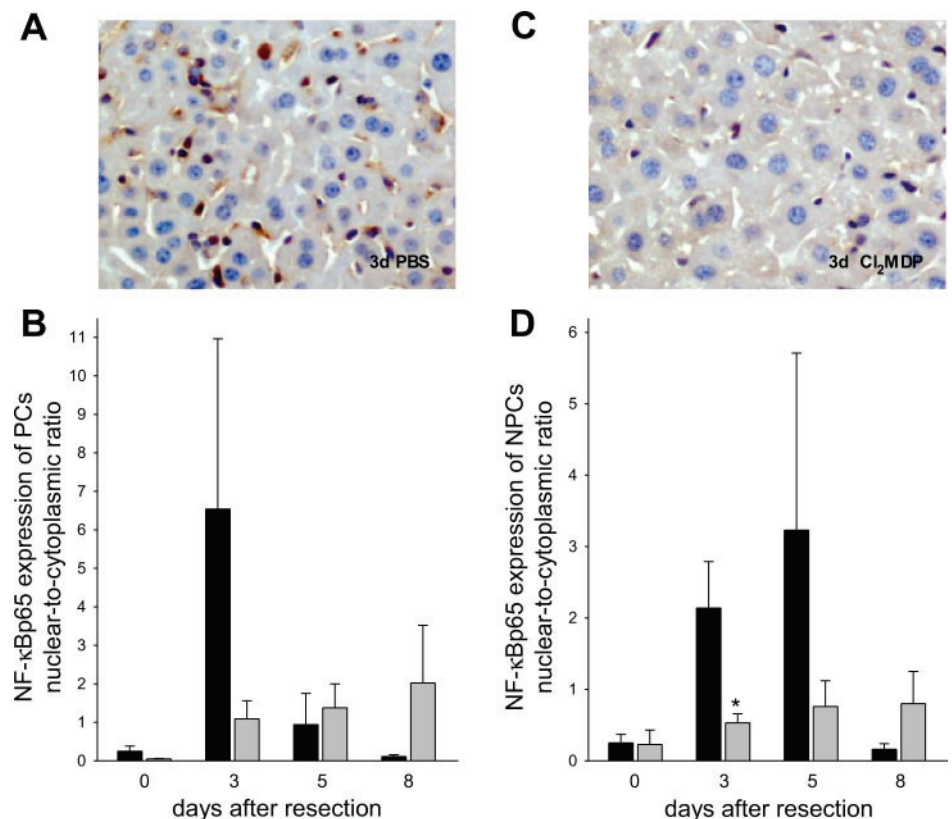
Fig. 4. Representative Western blot analysis (A) and densitometric analysis (B) of NF-κB p65 levels as well as NF-κBp65 transcription factor DNA-binding activity in hepatic nuclear extracts (C) at multiple time points after resection in controls (solid bars) and KC-depleted mice (shaded bars). OD, optical density. Western blot signals were corrected with that of β-actin serving as internal control. Values are means  $\pm$  SE of 6 independent experiments per group and time point. \* $P < 0.05$  vs. PBS.

present in the nuclei of parenchymal and nonparenchymal cells (Fig. 5, B–D).

**Effect of KC depletion on cytokine expression pattern in liver regeneration.** To examine the role of KCs in PH-evoked cytokine production, we measured serum concentrations of

several cytokines using a multiplex cytokine assay. As indicated in Fig. 6, serum TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations increased up to day 5 in KC-competent mice, whereas in KC-depleted mice cytokine expression failed to rise or was even found repressed at days 3 and 5 after resection (Fig. 6, A and

Fig. 5. Representative images of NF-κBp65 immunohistochemistry of liver tissue at day 3 upon PH in KC-competent (A) and KC-depleted mice (C). Note the increase and the nuclear location of NF-κBp65 immunostaining at day 3 upon PH in KC-competent mice (A), whereas there was a marked reduction of NF-κBp65-positive cells in the KC-depleted mice (C). In addition, in KC-depleted animals, NF-κBp65 immunostaining was almost exclusively restricted to the cytoplasmic compartment of hepatocytes. Original magnification,  $\times 400$ . B and D: quantitative analysis of NF-κBp65 immunohistochemistry with cellular and subcellular distribution, as given by the nuclear-to-cytoplasmic ratio of NF-κBp65 positivity in PCs (B) and NPCs (D) at days 0 (nonresected), 3, 5, and 8 after PH in KC-competent (solid bars) and KC-depleted mice (shaded bars). Note the predominant nuclear location of NF-κBp65 at day 3 after PH in hepatocytes (B) and at days 3 and 5 after PH in NPCs in KC-competent animals (D), whereas in KC-depleted animals, the nuclear-to-cytoplasmic ratio of NF-κBp65 positivity in both hepatocytes and NPCs hardly exceeds 1. Values are means  $\pm$  SE of 6 independent experiments per group and time point. ANOVA and post hoc comparison; \* $P < 0.05$  vs. PBS.





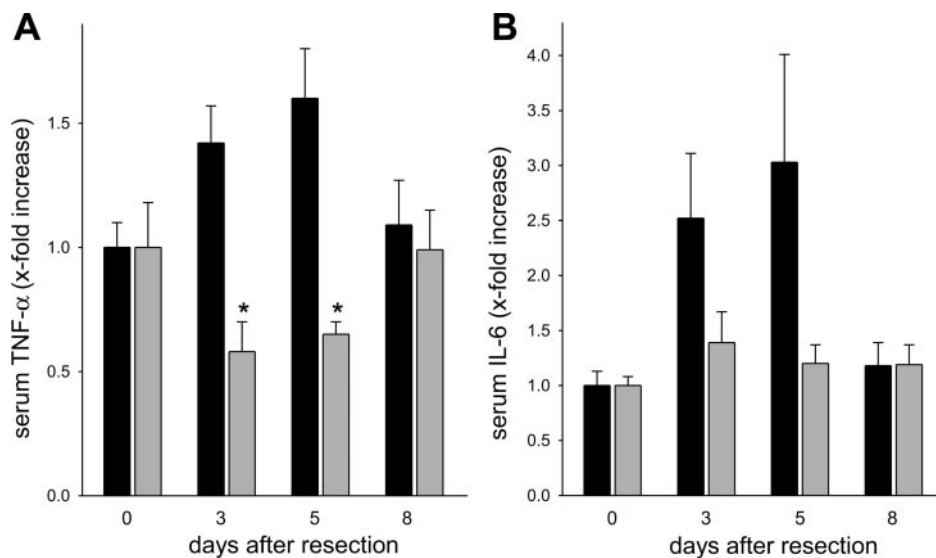


Fig. 6. Serum concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 at days 0, 3, 5, and 8 after PH in KC-competent (solid bars) and KC-depleted mice (shaded bars). Values are means  $\pm$  SE of 6 independent experiments per group and time point. ANOVA and post hoc comparison; \* $P$  < 0.05 vs. PBS.

B). Serum IL-10 concentrations of KC-competent and KC-depleted mice revealed a pattern similar to that of TNF- $\alpha$  (data not shown).

## DISCUSSION

In recent years, a number of *in vivo* and *in vitro* methods have been used to study the role and function of KCs under physiological and pathological conditions. These studies have led to controversial findings without any conclusive evidence of whether the net influence of KCs in liver regeneration is to stimulate or to diminish hepatocyte proliferation. This study now provides direct *in vivo* evidence for the stimulatory role of KCs in parenchymal cell proliferation upon hepatectomy.

**Methodological considerations.** Various models have been employed to clarify the functional role of KCs. However, many agents, such as gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>), might be inappropriate for this purpose, since they activate macrophages to secrete biologically active substances (35). The rare earth metal GdCl<sub>3</sub> itself activates intrahepatic cytokines, is retained in hepatocytes, and is indeed highly toxic (31). Using this substance to deplete KCs *in vivo*, Rai et al. (31) reported that GdCl<sub>3</sub> enhances the expression of hepatic TNF- $\alpha$  mRNA and promotes liver regeneration after subsequent PH. Given that TNF- $\alpha$  has been shown to promote hepatocyte mitosis upon PH (21), increased expression of hepatic TNF- $\alpha$  mRNA in GdCl<sub>3</sub>-treated animals might account for the observation of Rai et al. (31). IL-10, a cytokine that downregulates TNF- $\alpha$ , was found to be abolished in GdCl<sub>3</sub>-treated mice. Thus GdCl<sub>3</sub> treatment might enhance liver regeneration due to the absence of IL-10 in limiting the TNF- $\alpha$  surge (31). Apart from this, the use of GdCl<sub>3</sub> as an agent to induce KC inhibition provides further substantial difficulties in interpretation. For example, there is ongoing controversy as to whether GdCl<sub>3</sub> eliminates KCs or just alters macrophage function, phenotype (25), and acinar distribution (24).

In contrast, application of liposome-encapsulated Cl<sub>2</sub>MDP seems to be a more appropriate approach for investigating the effect of KC depletion on liver regeneration. Encapsulated Cl<sub>2</sub>MDP is nontoxic, and upon intracellular release of the substance, KCs are selectively eliminated without activation

(29, 36, 37). Therefore, we chose this approach for KC depletion in the present study. Our data show that KCs were eliminated within 24 h and during the whole observation period of Cl<sub>2</sub>MDP-liposome treatment, as demonstrated by the absence of F4/80-expressing cells in the present study as well as in studies of other groups (28, 35). In addition, the marked attenuation of phagocytosis of latex particles underlines the effectiveness of KC depletion in animals receiving Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes, because the remaining latex particle adherence can be attributed to sinusoidal endothelial cells (7, 39).

**Effect of KC depletion on liver regeneration.** The present study shows unequivocally that KC depletion by Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes resulted in reduced liver weights at days 5 and 8 after PH. With respect to the fact that KC-depleted mice revealed an increase of cumulative BrdU incorporation not only in hepatocytes but also in nonparenchymal cells, limited liver regeneration might be attributed to a delay rather than to a reduction in proliferation (26). In line with this view, Takeishi et al. (35) applied Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes first at day 3 after resection and, consequently, observed a reduction in the rate of hepatocyte proliferation at later stages of liver regeneration. However, the proliferation marker PCNA, which arises during the entire cell cycle (11), has been found to be markedly decreased over the whole observation period in KC-depleted mice. Additional analysis of the M-phase-specific protein cyclin B1 (40, 43) revealed an expression pattern comparable to that of PCNA, characterized by a significantly decreased protein expression at day 3 after PH in KC-depleted mice. Thus it might be speculated that KC-depletion interferes with the cell cycle at the transition from the S to the G<sub>2</sub>/M phases, because BrdU incorporation only reflects the synthesis phase of the cell cycle.

KCs are known to produce several kinds of biologically active mediators and seem to be the most important source of TNF- $\alpha$  (10). In contrast to KC-competent animals revealing a rise of TNF- $\alpha$  and IL-6 serum concentrations upon liver resection, KC-depleted mice failed to mount an equivalent cytokine response. Consistent with the ability of TNF- $\alpha$  to induce IL-6 (14, 27), the rise of TNF- $\alpha$  in KC-competent mice was paralleled by an increase of serum IL-6, whereas this

autocrine effect was missing in KC-depleted mice. Although TNF- $\alpha$ -deficient mice showed normal liver regeneration (16, 18), TNF- $\alpha$  has been regarded as an important promoter of hepatocyte proliferation (22). In support of this view, studies using antibodies against TNF- $\alpha$  have demonstrated a reduction of hepatocyte proliferation (2, 33). In addition, livers of MyD88-deficient mice exhibited an impaired regeneration also accompanied by blunted TNF- $\alpha$  and IL-6 expression (32). With the use of TNF receptor type 1-deficient mice, it has been shown that impaired liver regeneration resulted from the failure of NF- $\kappa$ B activation and subsequent suppression of IL-6 production in the liver of these mice after PH (41). Furthermore, using a murine model of bone marrow transplantation, Aldeguer et al. (3) showed clearly an importance of KC-derived IL-6 for adequate liver regeneration.

PH induces an early cellular response involving the transcription factor molecule NF- $\kappa$ B (15), which has been attributed a key role in the initiation of hepatocellular proliferation (23). Upon nuclear translocation, NF- $\kappa$ B induces the transcription of a large set of immediate-early genes (20, 34), which are particularly involved in the cell cycle regulation (6). Moreover, NF- $\kappa$ B is responsible for the expression of numerous proinflammatory mediators, including TNF- $\alpha$  (6, 20). In KC-competent mice we observed the highest NF- $\kappa$ Bp65 nuclear staining in hepatocytes at day 3 after resection, whereas in nonparenchymal cells NF- $\kappa$ Bp65 nuclear staining occurred over day 5. In line with this finding, it has most recently been shown that after PH, NF- $\kappa$ B expression mainly occurs in KCs (42). Presently, we have demonstrated that in KC-depleted mice both, hepatocytes and nonparenchymal cells almost completely lack the initial nuclear shuttle of NF- $\kappa$ Bp65. In parallel, DNA-binding activity of nuclear NF- $\kappa$ Bp65 was significantly reduced. This indicates that KC-depleted liver tissue desiderates appropriate NF- $\kappa$ B activation and subsequent TNF- $\alpha$  release. In support of this view, it has been shown that inhibition of NF- $\kappa$ B activation by overexpression of the inhibitor I $\kappa$ B reduces hepatocyte proliferation after PH by downregulation of IL-6 as a downstream event (9, 19, 42). Most notably, however, specific inhibition of hepatocellular NF- $\kappa$ B by using a transgenic mouse model did not impair DNA synthesis (8), indicating that KC-confined NF- $\kappa$ B expression in liver regeneration is more important than hepatocellular NF- $\kappa$ B activation. These data are consistent with the results of our study showing that decreased NF- $\kappa$ B activation is due to the absence of KCs, which in turn results in retardation of liver regeneration. Therefore, we finally suggest that hepatocyte proliferation during liver regeneration can be triggered by a signal transduction pathway that involves KC-specific NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL-6.

At first sight, increased BrdU staining in the present study contrasts the finding of reduced PCNA and cyclin B1 protein expression. However, it has been reported that inhibition of NF- $\kappa$ B results in a significant decrease in the number of mitotic figures in the regenerating liver without impairment of DNA synthesis (6). Because of this finding and the present results of decreased cyclin B1 expression in KC-depleted mice, we suppose a NF- $\kappa$ B-dependent alteration of the cell cycle at the S-to-G<sub>2</sub>/M phase transition. This might explain the observation that KC-depleted mice present with reduced liver regeneration despite increased DNA synthesis. However, further investiga-

tions of KC-depleted livers are necessary to specify the impact of KC-specific NF- $\kappa$ B on the cell cycle.

Taking all findings together, KCs turn out to be essential for intact liver regeneration by their NF- $\kappa$ B activation and effector downstream signals, such as TNF- $\alpha$  and IL-6 release. Thus KCs play a crucial role in liver regeneration by supporting cellular proliferation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We kindly thank Katrin Sievert, Dorothea Frenz, Maren Nerowski, Berit Blendow, and Doris Butzlaff (Institute for Experimental Surgery, University of Rostock) for excellent technical assistance.

#### GRANTS

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Vo 450/7-3) and by a FORUN grant of the Medical Faculty, University of Rostock.

#### REFERENCES

1. Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res* 134: 354–362, 2006.
2. Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 263: G579–G585, 1992.
3. Aldeguer X, Debonera F, Shaked A, Krasinkas AM, Gelman AE, Que X, Zamir GA, Hiroyasu S, Kovalovich KK, Taub R, Olthoff KM. Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* 35: 40–48, 2002.
4. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 26: 945–952, 1997.
5. Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 131: 251–256, 1998.
6. Black D, Bird MA, Hayden M, Schrum LW, Lange P, Samson C, Hatano E, Rippe RA, Brenner DA, Behrns KE. TNF- $\alpha$ -induced hepatocyte apoptosis is associated with alterations of the cell cycle and decreased stem loop binding protein. *Surgery* 135: 619–628, 2004.
7. Boulton RA, Alison MR, Golding M, Selden C, Hodgson HJ. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol* 29: 271–280, 1998.
8. Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF- $\kappa$ B leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 110: 193–202, 2002.
9. DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF- $\kappa$ B inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$ . *Hepatology* 42: 1148–1157, 2005.
10. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192: 245–261, 1990.
11. Dietrich DR. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. *Crit Rev Toxicol* 23: 77–109, 1993.
12. Ding H, Peng R, Reed E, Li QQ. Effects of Kupffer cell inhibition on liver function and hepatocellular activity in mice. *Int J Mol Med* 12: 549–557, 2003.
13. Eipel C, Schuett H, Glawe C, Bordel R, Menger MD, Vollmar B. Pifithrin- $\alpha$  induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 43: 829–835, 2005.
14. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 32: 19–31, 2000.
15. FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor  $\kappa$ B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ* 6: 417–427, 1995.
16. Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Riva-deneira DE, Stapleton PP, Daly JM. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 129: 48–54, 2001.
17. Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 16: 99–102, 2003.

18. Hayashi H, Nagaki M, Imose M, Osawa Y, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T, Kato T, Moriwaki H. Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor- $\alpha$ -deficient mice. *Liver Int* 25: 162–170, 2005.
19. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, Brenner DA. NF $\kappa$ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 101: 802–811, 1998.
20. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF- $\kappa$ B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3: 17–26, 2004.
21. Kinoshita M, Uchida T, Nakashima H, Ono S, Seki S, Hiraide H. Opposite effects of enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$  production from Kupffer cells by gadolinium chloride on liver injury/mortality in endotoxemia of normal and partially hepatectomized mice. *Shock* 23: 65–72, 2005.
22. Kirillova I, Chaisson M, Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Cell Growth Differ* 10: 819–828, 1999.
23. Laurent S, Horsmans Y, Stärkel P, Leclercq I, Sempoux, Lambotte L. Disrupted NF- $\kappa$ B activation after partial hepatectomy does not impair hepatocyte proliferation in rats. *World J Gastroenterol* 11: 7345–7350, 2005.
24. Lazar G. The reticuloendothelial blocking effect of rare earth metals in rats. *J Reticuloendothel Soc* 13: 231–237, 1979.
25. Lee CM, Yeoh GC, Olynyk JK. Differential effects of gadolinium chloride on Kupffer cells in vivo and in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 481–488, 2004.
26. Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Yang SQ, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, van Lambalgen AA, Dijkstra CD, van Leeuwen PA. Kupffer cell depletion by Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 20: 66–77, 2000.
27. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 276: 60–66, 1997.
28. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37: 16–28, 2004.
29. Naito M, Nagai H, Kawano S, Umezu H, Zhu H, Moriyama H, Yamamoto T, Takatsuka H, Takei Y. Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol* 3: 337–344, 1996.
30. Orfila C, Lepert JC, Alric L, Carrera G, Beraud M, Pipy B. Immunohistochemical distribution of activated nuclear factor  $\kappa$ B and peroxisome proliferator-activated receptors in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Histochem Cell Biol* 123: 585–593, 2005.
31. Rai RM, Loffreda S, Karp CL, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor  $\alpha$  messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology* 25: 889–895, 1997.
32. Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, Kishimoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 41: 443–450, 2005.
33. Shiratori Y, Hongo S, Hikiba Y, Ohmura K, Nagura T, Okano K, Kamii K, Tanaka T, Komatsu Y, Ochiai T, Tsubouchi H, Omata M. Role of macrophages in regeneration of liver. *Dig Dis Sci* 10: 1939–1946, 1996.
34. Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 17: 11181–11186, 2002.
35. Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 62: 413–422, 1999.
36. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174: 83–93, 1994.
37. Van Rooijen N. The liposome-mediated macrophage “suicide” technique. *J Immunol Methods* 124: 1–6, 1989.
38. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 20: 301–304, 1994.
39. Vollmar B, Rüttinger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD. Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock* 6: 434–441, 1996.
40. Wolf F, Wandke C, Isenberg N, Geley S. Dose-dependent effects of stable cyclin B1 on progression through mitosis in human cells. *EMBO J* 25: 2802–2813, 2006.
41. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1441–1446, 1997.
42. Yang I, Magness ST, Bataler R, Rippe RA, Brenner DA. NF- $\kappa$ B activation in Kupffer cells after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G530–G538, 2005.
43. Yu L, Sun ZJ, Wu SL, Pan CE. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer. *World J Gastroenterol* 9: 2341–2343, 2003.



## Kupffer Cells Are Mandatory for Adequate Liver Regeneration by Mediating Hyperperfusion via Modulation of Vasoactive Proteins

KERSTIN ABSHAGEN,\* CHRISTIAN EIPEL,\* JÖRG C. KALFF,† MICHAEL D. MENDER,  
AND BRIGITTE VOLLMAR\*

\*Institute for Experimental Surgery, University of Rostock, Rostock, Germany; †Department of Surgery, University of Bonn, Bonn, Germany; and Institute for Clinical & Experimental Surgery, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

### ABSTRACT

**Objective:** Physiological liver regeneration requires adequate microvascular perfusion after partial hepatectomy. Although Kupffer cells (KCs) are known to play a key role in modulating hepatocyte proliferation, their impact on regulating hepatic microcirculation during liver regeneration has so far been disregarded. With respect to their expression and modulation of vasoactive mediators, KCs may provide important signals that regulate hepatic perfusion during liver regeneration.

**Methods:** Intravital fluorescence microscopy, immunohistochemistry, Western blot analysis, and RT-PCR were used to analyze livers of KC-depleted mice (liposome-encapsulated clodronate application) and KC-competent mice at days 3, 5, and 8 after 68% hepatectomy.

**Results:** Selective and long-lasting KC elimination limited the resection-associated hyperperfusion, as evidenced by an only 1.7- to 2-fold increase of sinusoidal volumetric blood flow and shear stress in contrast to a 3.5- to 5-fold increase in KC-competent mice. In accordance to that livers of KC-depleted mice showed an altered pattern of vasoregulatory gene expression. KC-depleted mice failed to show resection-induced increase of HO-1 and eNOS protein expression, but revealed a reduction of hepatic eNOS and HO-1 protein levels to 22 and 12% of the corresponding values in KC-competent mice. In addition, the eNOS inhibitory protein caveolin-1 was increased in KC-depleted animals prior to as well as after resection. Furthermore, resection-associated accumulation of ET-1 mRNA was absent in KC-depleted livers. Finally, liver mass restoration was impaired, with a regain of only 79% weight within 8 days after resection in KC-depleted mice.

**Conclusion:** The present study documents a remarkable change of the vasoactive mediator profile upon KC-depletion and liver resection, limiting intrahepatic hyperperfusion. Therefore, KC-dependent molecular mechanisms seem to be mandatory in regulating vasotonus during the process of liver regeneration and therewith maintaining intrahepatic shear stress as a trigger of hepatic proliferation. *Microcirculation* (2008) 15, 37–47. doi:10.1080/10739680701412989

KEY WORDS: caveolin-1, clodronate, hepatic microcirculation, intravital fluorescence microscopy

Liver regeneration is associated with an increased expression of a diverse number of genes, including immediate early and delayed genes, as well as cell

cycle and mitosis genes [12, 28]. Regardless of the time frame, the most obvious change occurring after partial hepatectomy (PH) is an elevation in hemodynamic forces imposed on liver cells. These changes occur immediately upon resection and persist for several days. Liver tissue remodeling depends on an adequate hepatic microcirculation of the resting liver and comprises the development of a new hepatic microvasculature [45]. The role of KCs in this process has not been appreciated so far, though KCs are known to play an important role in liver regeneration by producing a variety of growth- and immuno-modulating mediators [43].

*The authors kindly thank Katrin Sievert, Dorothea Frenz, Maren Nerowski, Berit Blendow, and Doris Butzlaff (Institute for Experimental Surgery, University of Rostock) for their excellent technical assistance. This study is supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, Germany (Vo 450/7-3) and by a FORUN grant of the Medical Faculty, University of Rostock.*

*Address correspondence to Brigitte Vollmar, MD, Institute for Experimental Surgery, University of Rostock, 18055 Rostock, Germany. E-mail: brigitte.vollmar@med.uni-rostock.de*

*Received 3 December 2006; accepted 8 March 2007.*



KCs are strategically located in hepatic sinusoids, predominantly in the area adjacent to the terminal portal branches or in the periportal region [6]. They interact with numerous cell types, such as hepatocytes and endothelial cells, and mainly clear particulate and foreign materials from the portal circulation [30]. KCs are known to express a variety of vasoregulatory enzyme systems with release of vasoactive mediators [21]. The finely tuned balance between vasoconstrictors, i.e., endothelins (ET), and vasodilators, namely nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), has been considered to be essential for the local regulation of the hepatic microcirculation [31, 32]. Under stress, such as ischemia/reperfusion [41], endotoxemia [33], and reduced-size transplantation [32], this regulated balance becomes disrupted in favor of vasoconstriction. In turn, induction of heme oxygenase (HO)-1 in KCs may protect the cell against oxidative stress by improving nutritive perfusion via CO release [4]. It is hypothesized that the increase in blood flow-to-liver mass ratio after PH causes shear stress and the release of NO from endothelial cells, which triggers the liver regeneration cascade [38].

Due to the fact that endothelial lining cells, including KCs, are likely to be the first to sense changes in shear stress, there is a good reason to hypothesize that during liver regeneration KCs influence hepatocyte proliferation also by regulating hepatic microcirculation. We therefore studied hepatic microvascular perfusion, KC-dependent vasoactive mediators, and regulatory mechanisms following PH in KC-depleted animals and assessed their impact on the process of liver regeneration.

## MATERIALS AND METHODS

### Liposome Preparation and Administration

Dichloromethylene diphosphonate ( $\text{Cl}_2\text{MDP}$ ) was kindly provided as a gift from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).  $\text{Cl}_2\text{MDP}$  encapsulated in multilamellar liposomes (400 nm) was prepared using the method described by Van Rooijen and Sanders [44] with minor modifications. Inactive PBS-containing liposomes were prepared under identical conditions at the same time. All liposome preparations were stored under nitrogen gas and used within 14 days.

### Experimental Groups and Protocol

For depletion of KCs, mice received  $\text{Cl}_2\text{MDP}$ -liposomes (0.1 mL/10 g body weight (bw)) via the

tail vein under light ether anesthesia at 24 h prior to PH and at every 72 h after PH. Control animals received equivalent volumes of PBS-liposomes (0.1 mL/10 g bw). In KC-depleted and KC-competent mice (controls), livers were analyzed at 3, 5, and 8 days after PH ( $n = 6$  animals per group and time point) as well as in nonresected animals (day 0;  $n = 6$  animals per group).

### Liver Regeneration Model

Upon approval by the local government, all experiments were performed in accordance with the German legislation on protection of animals and the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council; NIH publication 86-23 revised 1985). Female C57BL/6J mice (10–12 weeks old, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were anesthetized by breathing isoflurane (1.5 vol%) and subjected to a 68% PH [10, 16]. The animals were allowed to recover from anesthesia and surgery under a red warming lamp and were held in single cages until the experiments followed at postoperative days 3, 5, and 8. Sham-operated animals without hepatic resection served as group day 0.

### Intravital Fluorescence Microscopy

Under ketamine/xylazine anesthesia (90/25 mg/kg bw IP) sham-treated controls and hepatectomized animals were subjected to intravital fluorescence microscopy. For this purpose, animals were placed in supine position on a heating pad for maintenance of body temperature at 36–37°C. Insertion of polyethylene catheters (PE 50, ID 0.58 mm, Portex, Hythe, UK) in the right carotid artery and left jugular vein allowed for assessment of systemic hemodynamics and for the injection of fluorescent dyes. After laparotomy the animals were positioned on their right side and the caudate lobe was exteriorized on a plasticine stage, allowing an ideal placement of the tissue with a plane focus level and minimal respiratory movement during the in vivo microscopic procedure. To keep the exteriorized liver moist and to exclude effects of ambient oxygen, the liver surface was covered with a glass slide. After the microscopy, liver tissue was sampled for subsequent immunohistochemical, biochemical, and molecular biology analysis ( $n = 6$  animals per time point and group).

Using a fluorescence microscope equipped with a 100-W mercury lamp (Axiotech vario, Zeiss,

Jena, Germany) and a filter for blue light epillumination (excitation/emission wavelength: 450–490 nm/>520 nm), microscopic images were taken by a  $\times 20/0.50$  W objective (Zeiss), recorded by a CCD video camera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Germany) and transferred to a video system (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokyo, Japan). Sodium fluorescein ( $2 \mu\text{mol/kg}$  IV; Merck, Darmstadt, Germany) served for enhancement of the tissue contrast enabling the assessment of sinusoidal perfusion within the individual microvessels [1, 10]. Fluorescence microscopic analysis of the hepatic microcirculation included the density and diameters of individual sinusoids, sinusoidal perfusion rate as well as red blood cell velocity ( $v_{\text{RBC}}$ ) within individual sinusoids [36]. For intravital microscopic analysis of KC phagocytic activity, plain fluorescent latex particles (diameter  $1.1 \mu\text{m}$ ; Polysciences, Warrington, PA) were injected intra-arterially through the carotid catheter ( $3 \times 10^6$  beads/10 g bw in isotonic saline) [46].

### Quantitative Video Analysis

Evaluation of microcirculatory parameters was performed off-line by frame-to-frame analysis of the videotaped images at a magnification of 400-fold, using a computer-assisted image analysis system with a 19-in. monitor (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Germany) [23]. Within 10 observation areas, sinusoidal perfusion rate was determined by counting the number of perfused sinusoids (given in percent of all sinusoids crossing a  $200\text{-}\mu\text{m}$  raster line) [1, 9, 10]. Diameters of sinusoids (given in  $\mu\text{m}$ ) were measured perpendicularly within 10 individual sinusoids in midzonal regions of each observation area (classification according to Rappaport [35]). Morphological density of sinusoids was analyzed by determining the total length of sinusoids per observation area (given in  $\text{cm}/\text{cm}^2$ ), regardless of whether they were perfused or not [1]. Per observation field, red blood cell velocity ( $v_{\text{RBC}}$ ) in midzonal regions of the sinusoidal pathway was assessed in a total of 5–10 individual sinusoids using the line-shift-diagram method [23]. Volumetric blood flow (VQ) in hepatic sinusoids was estimated from  $v_{\text{RBC}}$  and microvascular cross-sectional area ( $\pi r^2$ ) according to the equation of Gross and Aroesty (17), i.e.,  $\text{VQ} = v_{\text{RBC}} \pi r^2$  (36). Though the equation is very simplistic inasmuch as a cylindrical shape of the respective microvessel is assumed and values may not accurately reflect the actual flow, it allows assessment of relative differences between groups. Shear stress ( $\tau$ ) applied to the

hepatic microvasculature was calculated from the following formula:  $\tau = 4n \text{VQ}/\pi r^3$ , where  $r$  = radius and  $n$  = blood viscosity (18, 47). For assessment of kinetics of particle adherence, 20–25 selected observation areas per experiment were analyzed successively within 10 min after injection. The kinetics of adherence was quantified by the number of particles moving in sinusoids as a percentage of all particles visible in the area during observation for 10 s [46].

### Regeneration Study

Following in vivo microscopy animals were sacrificed and the remnant livers were harvested, weighed, and processed for subsequent analysis. The weight of regenerated liver was used to calculate the growth of residual liver lobes according to weight of regenerated liver/preoperative liver weight  $\times 100$  (%). Preoperative liver weight was assumed as 4.3% of body weight.

### Western Blot Analysis of Liver Tissue

For Western blot analysis of HO-1, eNOS, and caveolin-1, liver tissue was homogenized in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton-X 100, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , and 0.2 mM PMSF), incubated for 30 min on ice, and centrifuged for 15 min at  $10,000g$ . Prior to use, all buffers received a protease inhibitor cocktail (1:100 vol/vol; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Protein concentrations were determined using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin as standard. Equal amounts of whole protein extracts (HO-1:  $20 \mu\text{g}$ ; eNOS and caveolin-1:  $60 \mu\text{g}$ ) were separated discontinuously on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (eNOS: 8% SDS-PAGE, HO-1: 12% SDS-PAGE, caveolin-1: 14% SDS-PAGE), and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P transfer membrane; Millipore, Billerica, MA, USA). After blockade of nonspecific binding sites, membranes were incubated for 2 h at room temperature with polyclonal rabbit anti-HO-1 (1:5,000; Stressgen, Victoria, BC, Canada), monoclonal mouse anti-eNOS (1:400; Calbiochem, Darmstadt, Germany), and polyclonal mouse anti-caveolin-1 (1:1,500; BD Bioscience, Pharmingen CA, USA), followed by peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (HO-1: 1:10,000; Cell Signalling Technology, Frankfurt, Germany) or goat anti-mouse IgG antibody (eNOS: 1:40,000, caveolin-1: 1:10,000; Sigma Aldrich) as secondary antibodies. Protein expression



was visualized by means of luminol-enhanced chemiluminescence (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and exposure of the membrane to a blue light-sensitive autoradiography film (Kodak BioMax Light Film, Kodak-Industrie, Chalon-sur-Saone, France). Signals were densitometrically assessed (Quantity One, Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), normalized to the  $\beta$ -actin signals (monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin antibody, 1:20,000; Sigma Aldrich) or  $\beta$ -tubulin signals (polyclonal rabbit anti- $\beta$ -tubulin antibody, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and given as relative density.

### RT-PCR

Total RNA was isolated from 50 mg of liver tissue using TRIzol reagent (Life Technologies, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined spectrophotometrically. cDNA was prepared by reverse transcription of 2  $\mu$ g of total RNA using oligo(dT)<sub>18</sub> primer (Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) and Superscript II RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Mouse endothelin-1 (ET-1) was amplified by 34 cycles of PCR using Taq polymerase (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) and the following primers: 5'-TTA TCT CTG GCT CCA CGT TG-3' and 5'-AGC TCC TTG GAA AGT CAC GA-3'. In a comparable assay, the RNA integrity and cDNA synthesis was tested using mouse GAPDH as a housekeeping gene and the following primers: 5'-AAC GAC CCC TTC ATT GAC-3' and 5'-TCC ACG ACA TAC TCA GCA C-3'. PCR products were separated by electrophoresis on 2.0% agarose gels. Ethidium-bromide-stained bands were visualized by UV illumination and densitometrically quantified (Quantity One). The data represent expression of ET-1 gene product in relation to that of GAPDH.

### Immunohistochemistry

Liver tissue of animals at days 0, 3, 5, and 8 after resection was excised, fixed in 4% phosphate-buffered formalin for 2–3 days and then embedded in paraffin. From the paraffin-embedded tissue block, 5- $\mu$ m sections were cut. The degree of KC depletion was analyzed immunohistochemically by the F4/80 antigen (1:10, Serotec, Oxford, UK), a marker for resident tissue macrophages [43]. An overnight incubation at 4°C with the first antibody (polyclonal rat anti-F4/80) was followed by alkaline-phosphatase (AP)

conjugated mouse anti-rat immunoglobulin (1:200, Santa Cruz). The sites of AP-binding were detected by fuchsin (Dako Cytomation, Hamburg, Germany).

### Statistical Analysis

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. After testing for normality and equal variance across groups, differences between the groups were assessed by one-way ANOVA, followed by the appropriate post hoc comparison test, including Bonferroni probabilities to compensate for multiple comparisons. Statistical significance was set at  $p < .05$ . Statistics were performed using the software package Sigma-Stat (Jandel, San Rafael, CA, USA).

## RESULTS

### Evidence of KC Depletion

In all experiments we verified the completeness of KC depletion by immunostaining for the F4/80 antigen. Treatment with Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes at –24 h and subsequently every 72 h guaranteed absence of KCs at the time point of resection as well as during the whole 8-day period of regeneration (Figure 1A, B). There was no histological evidence of damage to hepatocytes or other cell subpopulations (Figure 1A, B).

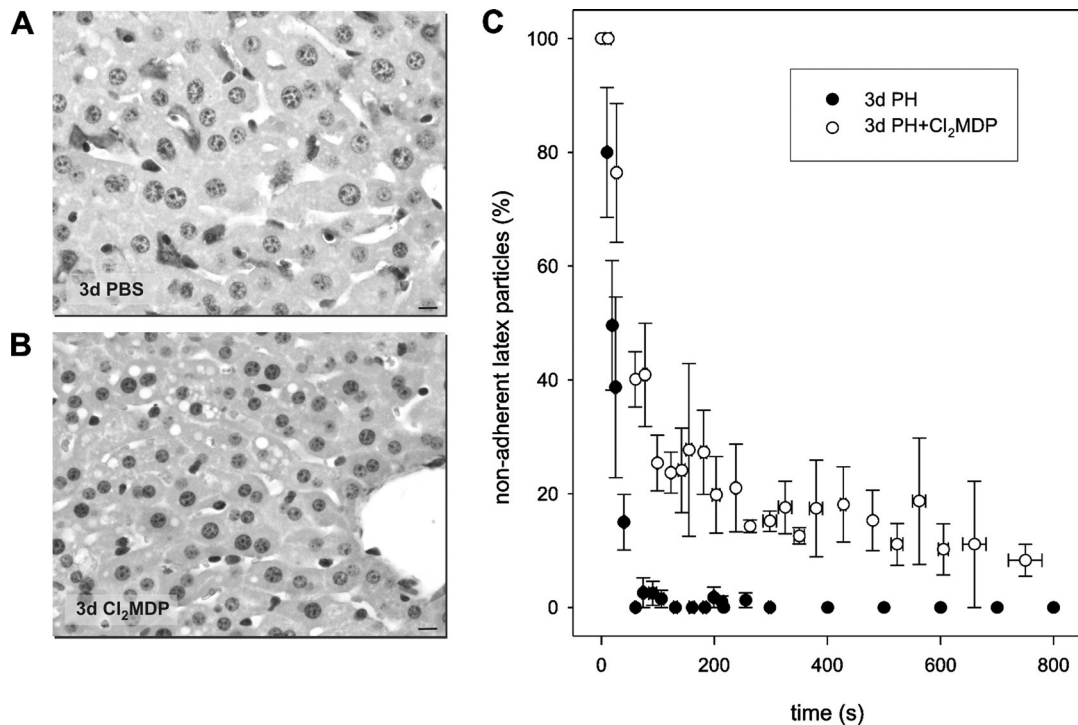
Uptake of fluorescent latex particles was used as functional parameter of KC phagocytosis. Following Cl<sub>2</sub>MDP-liposome treatment there was a distinct attenuation in clearance of latex particles from blood, but without complete blockade of particle adherence (Figure 1C).

### Macrohemodynamics

Baseline MAP and HR did not differ between KC-depleted groups and their respective PBS-treated animals (data not shown).

### Hepatic Microhemodynamics

Analysis of the hepatic microcirculation by in vivo fluorescence microscopy included the assessment of sinusoidal perfusion rate, sinusoidal diameters, and red blood cell velocity ( $v_{RBC}$ ) with subsequent calculation of volumetric blood flow and shear stress in hepatic sinusoids. Hepatic microvasculature in KC-depleted mice was characterized by the deterioration of nutritive perfusion with a considerable number of nonperfused sinusoids. This was indicated



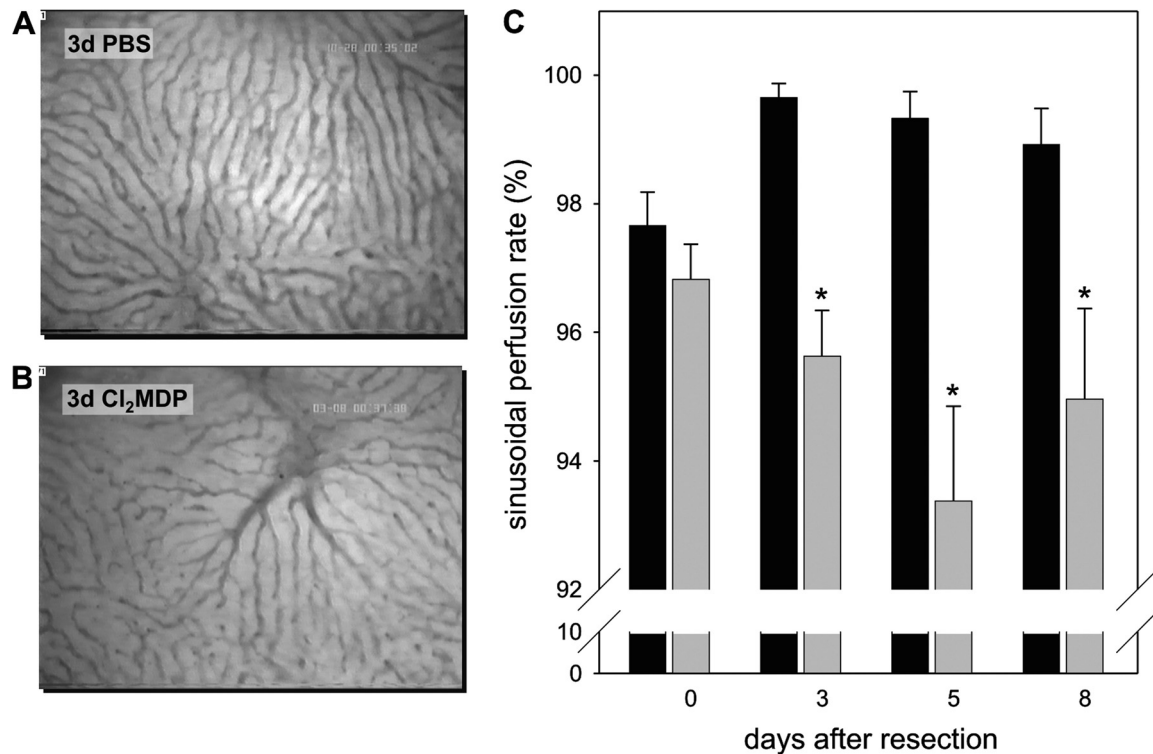
**Figure 1.** Representative images of hepatic tissue for F4/80 antigen immunostaining at day 3 after PH of (A) a control and (B) a KC-depleted animal. While KCs are easily identified in control sections, KCs are missing upon Cl<sub>2</sub>MDP-liposome treatment. Scale bars represent 10  $\mu$ m. (C) Latex particle adherence, as assessed by the fraction of non-adherent particles using intravital fluorescence microscopy, at day 5 after PH in KC-competent (filled circles) and KC-depleted animals (open circles). Values are means  $\pm$  SEM. Note the marked delay and reduction of latex particle adherence in the KC-depleted animal, confirming the absence of KC-confined phagocytic activity.

by a sinusoidal perfusion rate below 96% at all time points after resection (Figure 2B, C), while liver microcirculation in KC-competent animals presented with almost 100% of sinusoids forwarding blood (Figure 2A, C). Quantitative analysis of the hepatic microhemodynamics in KC-depleted animals revealed lower values of  $v_{RBC}$  at days 3 and 5 after resection when compared to the corresponding PBS-treated groups (Table 1). In addition, these animals failed to demonstrate dilatation of hepatic sinusoids as could be observed upon resection in KC-competent controls (Figure 3A). As a consequence, volumetric blood flow in sinusoids of the liver was found significantly decreased during the early post PH time points (Figure 3B). Calculation of microvascular shear stress revealed a profound difference between clodronate- and PBS-liposome treated animals with almost no resection-induced rise of shear stress in mice lacking KCs (Figure 3C). Interestingly, analysis of the morphological sinusoidal density showed significantly decreased values in KC-depleted mice only at the late time point of 8 days after PH (Table 1).

### Vasoactive Gene Expression

HO-1 protein expression upon regeneration in KC-competent and KC-depleted mice, as assessed by Western blot analysis, is depicted in Figure 4A, B. Resection-induced liver regeneration was accompanied by a rise in HO-1 protein level, which was found almost completely blocked upon resection in KC-depleted animals (Figure 4A, B). Changes in the expression of the vasoconstrictor gene ET-1 are shown in Figure 4C, D. The level of ET-1 mRNA increased upon resection, while KC-depleted mice showed decreased ET-1 mRNA accumulation.

There was only a moderate increase of eNOS protein levels upon PH and the subsequent observation period of 8 days (Figure 5A, B). KC depletion decreased the protein levels of eNOS in the regenerating liver when compared to the KC-competent controls. The level of eNOS was reduced to almost 22% at day 3 in KC-depleted mice and was not fully recovered to the levels of controls for up to 8 days. Thereupon we



**Figure 2.** (A, B) Representative intravital fluorescence microscopic images of the hepatic sinusoidal microvasculature at day 3 upon PH and (C) quantitative analysis of sinusoidal perfusion at days 0, 3, 5, and 8 after PH in KC-competent (black bars) and KC-depleted mice (gray bars). Note the impairment of sinusoidal perfusion rate at all time points after resection in mice lacking KCs. Values are given as means  $\pm$  SEM of 6 animals per group and time point. ANOVA and post hoc comparison; \* $p < .05$  vs. KC-competent controls.

determined the expression of the eNOS inhibitory protein caveolin-1. Though not statistically significant, there was an increase of caveolin-1 protein levels in KC-depleted mice, both prior to and during the follow up of resection (Figure 5C, D).

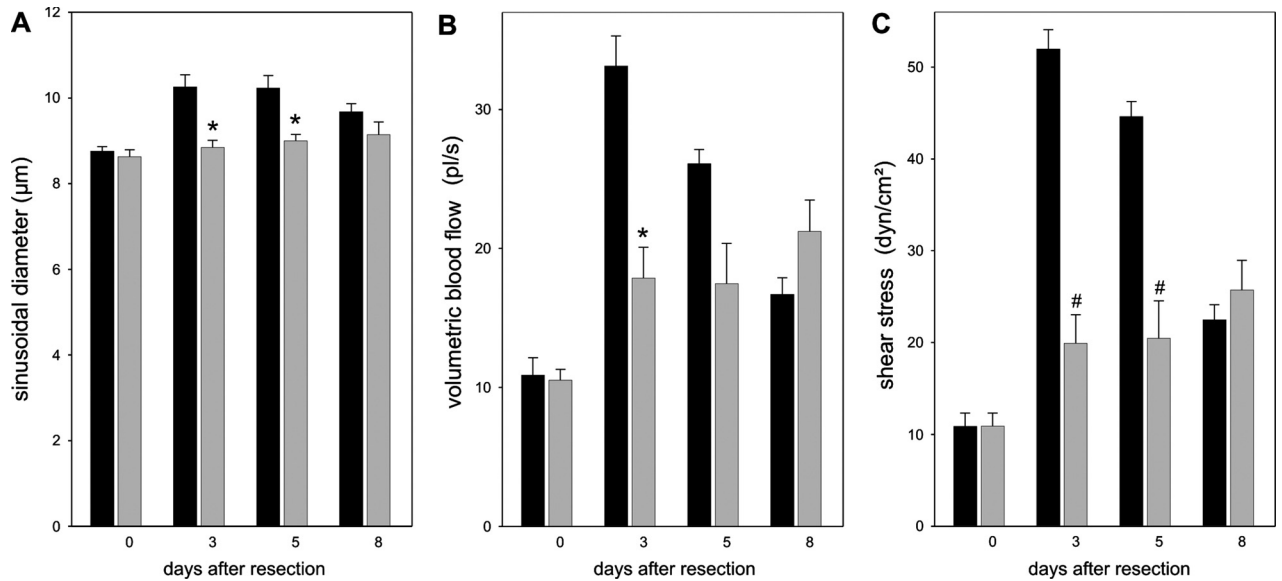
#### Liver Regeneration

Liver mass resected at day 0 was comparable between KC-competent and KC-depleted animals and averaged  $570 \pm 10$  mg and  $502 \pm 14$  mg. Assessment of liver weight upon resection revealed a regain

**Table 1.** Red blood cell velocity ( $v_{RBC}$  in  $\mu\text{m/s}$ ) in hepatic sinusoids, morphological sinusoidal density ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ), and liver weight (%) at days 0, 3, 5, and 8 after PH in PBS-liposome- and  $\text{Cl}_2\text{MDP}$ -liposome-treated mice

	Day 0	Day 3	Day 5	Day 8
$v_{RBC}$ ( $\mu\text{m/s}$ )				
PBS	$179 \pm 21$	$393 \pm 30$	$317 \pm 13$	$235 \pm 16$
$\text{Cl}_2\text{MDP}$	$179 \pm 6$	$290 \pm 73$	$274 \pm 40$	$332 \pm 49$
Morphological sinusoidal density ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ )				
PBS	$497 \pm 17$	$642 \pm 9$	$561 \pm 18$	$610 \pm 10$
$\text{Cl}_2\text{MDP}$	$506 \pm 10$	$640 \pm 7$	$534 \pm 25$	$530 \pm 12^*$
Liver weight (%)				
PBS	$100 \pm 0$	$70 \pm 2$	$85 \pm 3$	$91 \pm 3$
$\text{Cl}_2\text{MDP}$	$100 \pm 0$	$72 \pm 4$	$79 \pm 4$	$79 \pm 4^*$

*Note.* Values of 6 animals per group and time point are given as means  $\pm$  SEM; ANOVA and post hoc comparison; \* $p < .05$  vs. PBS-liposome-treated mice.



**Figure 3.** (A) Sinusoidal diameter and (B) volumetric blood flow in hepatic sinusoids, as assessed by in vivo fluorescence microscopy at multiple time points upon PH in controls (black bars) and KC-depleted mice (gray bars). (C) Shear stress ( $\tau$ ) in hepatic sinusoids calculated according to the following formula:  $\tau = 4n VQ/\pi^3$ . Values are means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments per group and time point. ANOVA and post hoc comparison; \* $p < .05$  and # $p < .001$  vs. KC-competent controls.

in weight at day 8 up to  $\sim 91\%$  in the KC-competent controls, while in KC-depleted animals liver weight reached only 79% of the initial value, indicating reduced liver mass restoration (Table 1).

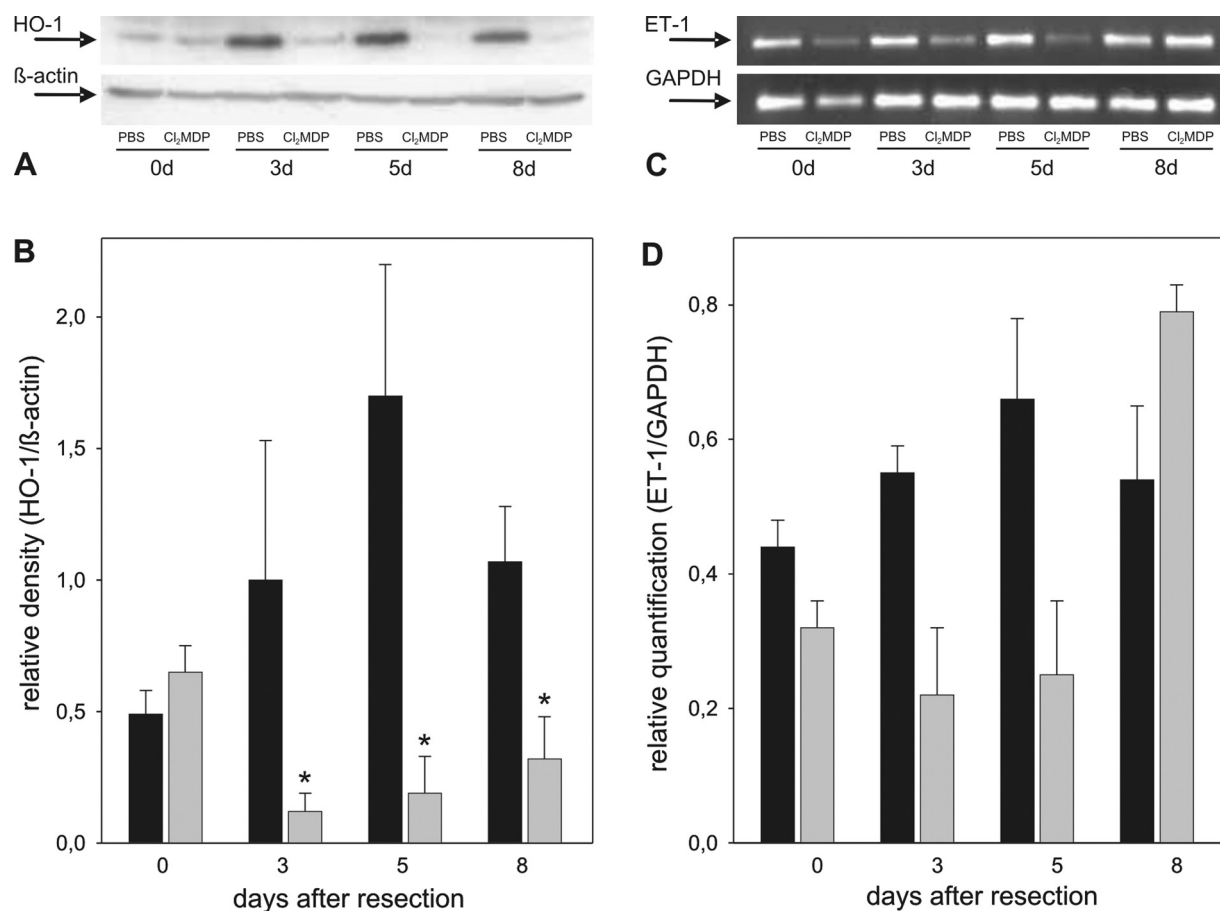
## DISCUSSION

Investigating liver regeneration in animals following selective elimination of KCs by liposomal encapsulated clodronate is an approach that can identify the effect not only on hepatocyte proliferation [27, 40, 43], but also and most interestingly on hepatic microcirculation. Upon partial hepatectomy the remaining liver is perfused by its initial blood volume, thereby exposing liver cells, in particular KCs and sinusoidal endothelial cells, to excessive hemodynamic forces. Based on timescale events, shear stress inflicted on liver cells precedes the expression of factors, some of which are expressed within minutes. Recent studies demonstrate an impairment of liver regeneration after KC depletion [27, 40, 43], as reflected by downregulation of transcription factors like NF $\kappa$ B [5, 22, 48], alteration of cytokine expression, and finally decrease of hepatocellular proliferation. The present study confirms the decrease of liver regeneration upon KC depletion, but extends the current knowledge by direct in vivo evidence that KCs play a regulatory role in hepatic microcirculation during

liver regeneration, most supposedly via their expression of HO-1. KCs seem to be mandatory for an adequate liver regeneration by their impact on microvascular tonus and shear stress control as an initial trigger of liver regeneration.

## Direct Effects of KCs

KCs have been repeatedly associated with the intrahepatic control of microvascular blood flow, not only due to their zonal distribution within hepatic sinusoids [2, 26], but in particular due to their potential to express vasoactive enzyme systems [20, 21]. Among those, HO-1, also known as heat shock protein 32, is induced by oxidative stress, heat shock, and other potentially injurious stimuli including tissue resection [3]. This enzyme controls heme metabolism and generates CO, a potent vasodilative gaseous molecule [42]. Although constitutive expression of HO-1 in the normal liver is restricted to KCs [3, 19], the gene is in dependency to the insult also inducible in parenchymal liver cells [4, 37]. In the present study, there was a 3-fold increase in HO-1 protein during liver regeneration from day 3 to 8, while HO-1 protein was significantly depressed toward undetectable levels by clodronate treatment, adducing KCs as the major source of HO-1 during the regeneration process. These findings were



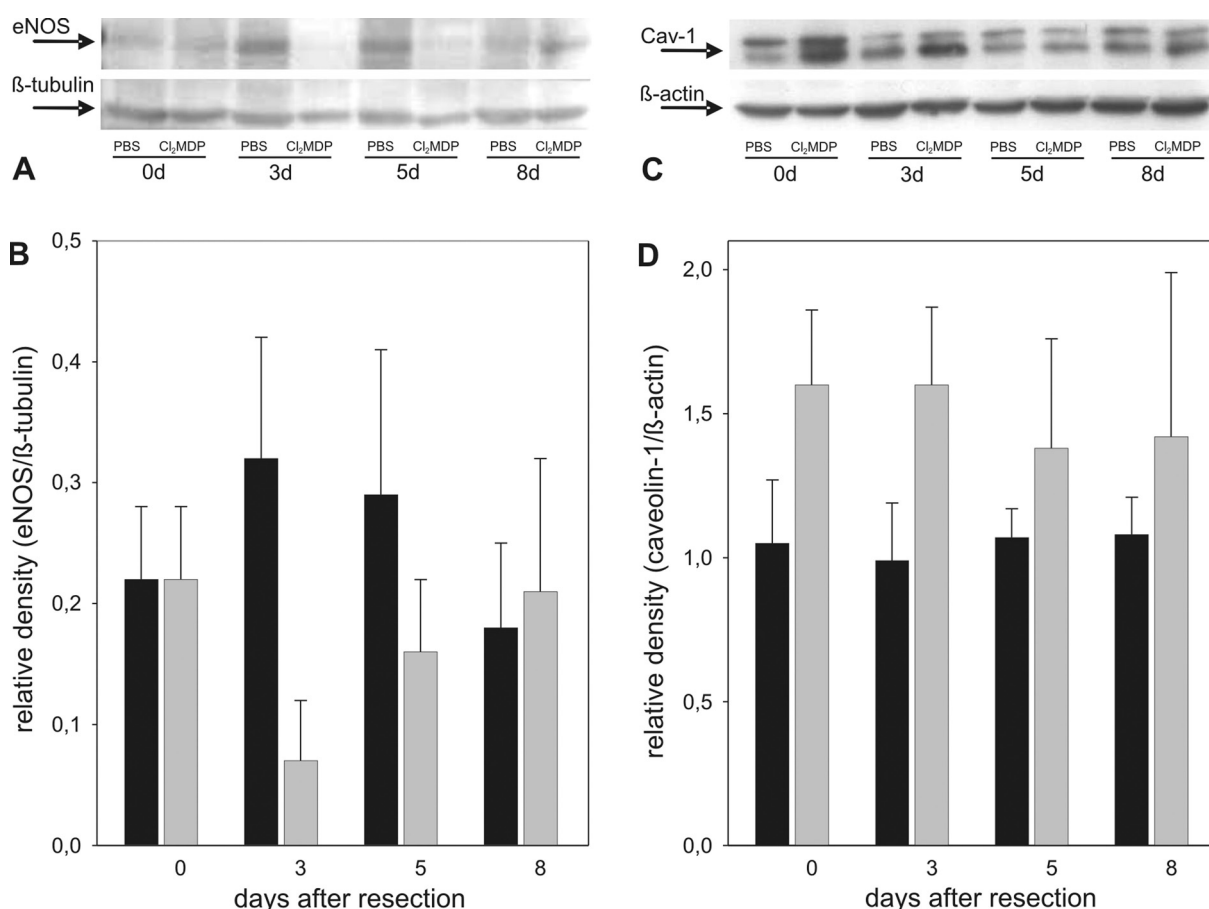
**Figure 4.** Representative (A) Western blot analysis and (B) densitometric analysis of HO-1 protein levels at multiple time points after resection in controls (black bars) and KC-depleted mice (gray bars). Signals were corrected with that of  $\beta$ -actin serving as internal control. Representative (C) RT-PCR analysis and (D) densitometric analysis of ET-1 mRNA expression at multiple time points upon PH in controls (black bars) and KC-depleted mice (gray bars). Signals were corrected with that of GAPDH. Values are given as means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments per group and time point. ANOVA and post hoc comparison; \* $p < .05$  vs. KC-competent controls.

confirmed by immunohistochemistry, representing a near absence of positive HO-1 immunostaining for more than 8 days in KC-depleted mouse livers when compared to controls (data not shown). These findings provide convincing evidence that under the conditions of PH, upregulation of HO-1 is restricted to nonparenchymal cells and depends on intact KC function [3, 24]. In several other injury models blockade of KCs also abolished HO-1 mRNA and protein induction [21, 34]. Duckers et al. [7] could demonstrate that the HO-1 signaling pathway exerts a physiological role in the vasculature by promoting vasodilation. In line with this, liver regeneration of postischemic livers following PH was improved by overexpression of HO-1 [15]. As the HO-1 metabolite CO serves as a relaxant for hepatic sinusoids, it is highly likely to assume that in the present study

deficit of HO-1 in KC-depleted mice over days and, thus, limited CO release might be responsible for the lack of the resection-induced sinusoidal vasodilation.

#### Interaction of KCs and Sinusoidal Endothelial Cells (SECs)

Adequate sinusoidal perfusion is maintained under the fine balance of vasoconstrictor and vasodilator enzyme systems and their mediators [33]. KC-related products may serve as paracrine regulators of stress genes of other liver subpopulations that are necessary to maintain liver blood flow under stress conditions. Thus, activation of KCs leads to the generation of inflammatory mediators, such as cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ ) and other vasoactive mediators, which directly affect SECs to produce NO and ET-1 and



**Figure 5.** Representative Western blot analysis (A, C) and densitometric analysis (B, D) of eNOS (A, B) and caveolin-1 (C, D) protein levels at multiple time points after resection in controls (black bars) and KC-depleted mice (gray bars). Signals were corrected with that of  $\beta$ -tubulin and  $\beta$ -actin serving as internal control. Values are means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments per group and time point. ANOVA and post hoc comparison statistical significance condition.

vice versa [8]. Thus, it is reasonable to state that the KC absence-associated failure to respond to resection with the rise of HO-1 protein over 8 days after resection in turn results in attenuation of sinusoidal vasodilation and intrahepatic hyperperfusion. This reduction of intrahepatic shear stress may further cause the lack of resection-induced rise of eNOS protein, because it is known that resection-induced increase of shear stress, resulting from the rise of the blood flow-to-liver mass ratio, causes the upregulation and activation of eNOS [29, 38]. In addition, caveolin-1 protein levels in KC-depleted animals, albeit only slightly increased, might interfere with eNOS function, as it has been reported that caveolin-1 negatively regulates eNOS function [13, 39]. Caveolin-1 represents a principal structural protein of caveolae and co-exists with eNOS in the plasma membrane of sinusoidal endothelial cells,

leading to enzyme inhibition [14, 31]. The slight increase of caveolin-1 protein levels in KC-depleted livers prior to as well as after resection might imply that KCs are involved in the local control of sinusoidal blood flow by regulating caveolin-1 expression and caveolin-1/eNOS interaction. In line with this, caveolin-1 protein overexpression caused a depressed basal and stimulated production of NO in a model of experimental cirrhosis [39]. It is conceivable to state that in KC-depleted mice dissociation of caveolin-1 from caveolae in response to the hemodynamic changes is blocked, as shear stress is low, with thus an increase of the normal allosteric inhibition of eNOS leading to a decreased activity of eNOS.

Besides the vasodilating enzyme systems HO-1 and NOS, vasoconstrictive endothelins, which are derived from vascular endothelial cells, have also been



considered to be essential for the local control of hepatic sinusoidal blood flow [32]. In our study, the level of ET-1 mRNA transcript increased after resection in KC-competent mice, but decreased in clodronate-treated animals, suggesting that KCs up-regulate ET-1 mRNA expression in a paracrine fashion through release of cytokines such as TGF- $\beta$  [8, 25]. Hence, paracrine signaling mechanisms operate between KCs and SECs in which cytokines and vasoactive mediators of KCs stimulate the expression and secretion of endothelial-derived vasomodulating proteins [8].

## CONCLUSIONS

Collectively, these results suggest that during the regeneration process KCs are involved in the local regulation of hepatic microcirculation, being mandatory for mediating intrahepatic hyperperfusion. There is convincing evidence that KC- and endothelium-derived vasoconstrictors and vasodilators, working in concert, are functionally important in the control of local hepatic blood flow and intravascular shear stress, which in turn affect the regeneration process. KCs play a dual role in liver regeneration by supporting both cellular proliferation and tissue microcirculation.

## REFERENCES

- Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. (2006). Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res* 134:354–362.
- Baier PK, Baumgartner U, Hempel S, Wolff-Vorbeck G, von Dobschuetz E, Hopt UT. (2005). Kupffer cells infiltrate liver tissue early after ischemia-reperfusion and partial hepatectomy. *Eur Surg Res* 37:290–297.
- Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B, Pannen BH, Clemens MG, Bauer M. (1998). Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology* 27:829–838.
- Bauer M, Bauer I. (2002). Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 4:749–758.
- Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. (2002). Hepatocyte-specific inhibition of NF-kappaB leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 10:193–202.
- Ding H, Peng R, Reed E, Li QQ. (2003). Effects of Kupffer cell inhibition on liver function and hepatocellular activity in mice. *Int J Mol Med* 12:549–557.
- Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, Clinton Webb R, Lee ME, Nabel GJ, Nabel EG. (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med* 7:693–698.
- Eakes AT, Olson MS. (1998). Regulation of endothelin synthesis in hepatic endothelial cells. *Am J Physiol* 274:G1068–1076.
- Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. (2004). Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G769–776.
- Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B. (2005). Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 241:477–484.
- Eipel C, Schuett H, Glawe C, Bordel R, Menger MD, Vollmar B. (2005). Pifithrin-alpha induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 43:829–835.
- Fausto N. (2000). Liver regeneration. *J Hepatol* 32:19–31.
- Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. (2001). Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299:818–824.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. (1996). Endothelial nitric oxide is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with Caveolin-1. *J Biol Chem* 271:27237–27240.
- Glanemann M, Schirmeier A, Lippert S, Langrehr JM, Neuhaus P, Nussler AK. (2005). Cobalt-protoporphyrin induced heme oxygenase overexpression and its impact on liver regeneration. *Transplant Proc* 37:3223–3225.
- Greene AK, Puder M. (2003). Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 16:99–102.
- Gross JF, Aroesty J. (1972). Mathematical models of capillary flow: a critical review. *Biorheology* 9:225–264.
- Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. (1998). Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 28:1467–1473.
- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, Iwahara S, Ramadori G, Fahimi HD. (2003). Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem* 51:1621–1631.
- Keller SA, Paxian M, Ashburn JH, Clemens MG, Huynh T. (2005). Kupffer cell ablation improves hepatic microcirculation after trauma and sepsis. *J Trauma* 58:740–751.
- Kim YH, Lee SM. (2004). Role of Kupffer cells in the vasoregulatory gene expression during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res* 1:111–117.



22. Kirillova I, Chaisson M, Fausto N. (1999). Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Cell Growth Differ* 10:819–828.
23. Klysz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. (1997). Cap image—a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42:168–175.
24. Kobayashi T, Hirano K, Yamamoto T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M. (2002). The protective role of Kupffer cells in the ischemia-reperfused rat liver. *Arch Histol Cytol* 65:251–261.
25. Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, Wang XF. (1999). Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4844–4849.
26. MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 269:G692–G698.
27. Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, Schouten HJ, Schouten HJ, Meijer S, van Rooijen N, van Lambalgen AA, Dijkstra CD, van Leeuwen PA. (2000). Kupffer cell depletion by Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 20:66–77.
28. Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997). Liver regeneration. *Science* 276:60–66.
29. Moncada S, Higgs EA. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 176:213–254.
30. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37:16–28.
31. Oda M, Yokomori H, Han JY. (2003). Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 29:167–182.
32. Palmes D, Minin E, Budny T, Uhlmann D, Armann B, Stratmann U, Herbst H, Spiegel HU. (2005). The endothelin/nitric oxide balance determines small-for-size liver injury after reduced-size rat liver transplantation. *Virchows Arch* 447:731–741.
33. Pannen BH, Bauer M, Zhang J, Robotham JL, Clemens MG. (1996). A time-dependent balance between endothelins and nitric oxide regulating portal resistance after endotoxin. *Am J Physiol* 271:H1953–H1961.
34. Paxian M, Rensing H, Rickauer A, Schonhofen S, Schmeck J, Pannen BH, Bauer I, Bauer M. (2001). Kupffer cells and neutrophils as paracrine regulators of the heme oxygenase-1 gene in hepatocytes after hemorrhagic shock. *Shock* 15:438–445.
35. Rappaport AM. (1973). The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 6:212–228.
36. Richter S, Vollmar B, Mucke I, Post S, Menger MD. (2001). Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. *J Physiol* 531:193–201.
37. Rizzardini M, Zappone M, Villa P, Gnocchi P, Sironi M, Diomedea L, Meazza C, Monshouwer M, Cantoni L. (1998). Kupffer cell depletion partially prevents hepatic heme oxygenase 1 messenger RNA accumulation in systemic inflammation in mice: role of interleukin 1beta. *Hepatology* 27:703–710.
38. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. (2001). Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* 5:453–464.
39. Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papatropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. (1999). Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 117:1222–1228.
40. Shiratori Y, Hongo S, Hikiba Y, Ohmura K, Nagura T, Okano K, Kamii K, Tanaka T, Komatsu Y, Ochiai T, Tsubouchi H, Omata M. (1996). Role of macrophages in regeneration of liver. *Dig Dis Sci* 10:1939–1946.
41. Sonin N, Garcia-Pagan J, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. (1999). Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. *Shock* 11:175–179.
42. Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. (1994). Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1333–1337.
43. Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. (1999). The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 62:413–422.
44. Van Rooijen N, Sanders A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174:83–93.
45. Vogten JM, Smakman N, Voest EE, Borel Rinkes ICH. (2003). Intravital analysis of microcirculation in the regenerating mouse liver. *J Surg Res* 113:264–269.
46. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. (1994). Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 20:301–304.
47. Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak KJ, Heinze G. (2003). Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp Physiol* 88:431–440.
48. Yang I, Magness ST, Bataler R, Rippe RA, Brenner DA. (2005). NF- $\kappa$ B activation in Kupffer cells after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G530–G538.